

## LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING TA 2008



1000171

- Judul : Analisis Kelainan Fungsi Insulin Receptor Family sebagai  
Penanda Awal Sexual-dysfunction pada Penderita DM
- Ketua : Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D.
- Anggota : 1. Dr. Sri Widyarti, M.Si.  
2. Prof.dr. Djoko Wahono Soeatmadji, Sp.PD,KE.  
3. Dr.drh. Aulanni'am, DES

Dibiayai Oleh Direktorat Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Hibah Penugasan Penelitian Desentralisasi  
Nomor: 320/SP2H/PP/DP2M/III/2008, tanggal 5 Maret 2008  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional

UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
DESEMBER 2008

## HALAMAN PENGESAHAN LAPORAN PENELITIAN HIBAH BERSAING

1. Judul Penelitian : Analisis Kelainan Fungsi Insulin Receptor Family sebagai Penanda Awal Sexual-dysfunction pada Penderita Diabetes Mellitus
2. Ketua Peneliti
- a. Nama Lengkap dan Gelar : Dra. Fatchiyah, M.Kes.,Ph.D.
  - b. Jenis Kelamin : Perempuan
  - c. NIP. : 131 837 970
  - d. Jabatan Fungsional : Dosen
  - e. Jabatan Struktural :
  - f. Bidang Keahlian : Biologi molekuler
  - g. Fakultas/Jurusan : MIPA/Biologi
  - h. Perguruan Tinggi : Universitas Brawijaya, Malang
  - i. Tim Peneliti

NAMA	BIDANG KEAHLIAN	FAKULTAS/JURUSAN	PERGURUAN TINGGI
1. Dra. Fatchiyah, M.Kes.,Ph.D (Ketua)	Biologi molekuler	MIPA/Biologi	Universitas Brawijaya
2. Dr. Sri Widyarti, M.Si. (anggota)	Biologi Sel/Immunologi	MIPA/Biologi	Universitas Brawijaya
3. Prof.dr. Djoko Wahono Soeatmadji, Sp.PD.KE. (Anggota)	Dokter Spesialis Penyakit dalam	Kedokteran	Universitas Brawijaya
4. Dr.drh. Aulanni'am, DES. (Anggota)	Biokimia	MIPA/Kimia	Universitas Brawijaya

3. Pendanaan dan jangka waktu penelitian:

- a. Jangka waktu penelitian yang diusulkan : 3 tahun (Th. 2008 - 2010)
- b. Biaya Total yang diusulkan : Rp. 105.000.000,- (3 tahun)
- c. Biaya yang disetujui tahun 2008 : Rp. 35.000.000,-

Mengetahui,  
Dekan  
Fakultas MIPA

(Dr. Marjono, M.Phil.)  
NIP. 131 785 254

Malang, 12 December 2008  
Ketua Peneliti,

(Dra. Fatchiyah, M.Kes.,Ph.D.)  
NIP. 131 837 970

Menyetujui,  
Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Brawijaya  
Ketua,

(Prof.Dr.Ir. Siti Chuzaemi, MS.)  
NIP. 130 809 321



## RINGKASAN DAN SUMMARY

Resistensi insulin berperan dalam patogenesis penyakit DM. Predisposisi dari resistensi insulin merupakan gabungan faktor genetik dan lingkungan. Analisa peran *receptor insulin* (Ir-Igflr-Irr) yang terkait faktor genetik dan hubungannya dengan diabetes telah banyak dilakukan pada hewan coba, *gene-disrupted* pada Ir-Igflr-Irr pada individu yang sama menyebabkan *sex-reversal* dari *male-to-female* secara spontan, hal ini diduga ketiga gen reseptor ini berperan pada diferensiasi sex. Selama ini, *sexual dysfunction* pada penderita DM selalu diasumsikan karena faktor lingkungan bukan karena faktor genetik. Diduga abnormalitas dari gen Igflr, Ir, dan Irr secara simultan berkaitan dengan *sexual dysfunction* yang terjadi pada DM. Tujuan penelitian ini kelainan sex pada penderita DM biasanya muncul setelah masa remaja atau dewasa, maka perlu dibuat suatu marker spesifik sebagai alat deteksi dini, agar tindakan preventif bisa dilakukan jauh sebelumnya. Penelitian ini akan dilakukan secara bertahap selama 3 tahun diawali Pada tahun pertama adalah tahap identifikasi insulin reseptor family yang spesifik orang Indonesia yaitu dengan melacak dan mengidentifikasi kelainan gen Igflr, Ir dan Irr pada penderita DM dengan onset sexual dysfunction.

Analisis sequencing baru dilakukan sebagian sampel yang diduga menunjukkan kelainan, seperti pada lampiran 4. Sampel DNA lainnya akan dilakukan pada tahun kedua. Hasil sequence alignment untuk IR exon 22 menunjukkan pasien nomor 8 dan 35 yang diduga mempunyai kelainan Cijumpai ada perbedaan dibanding dengan pasien DMK9 dan kontrol normal nomor 11. Berdasarkan alignment sequence dari cDNA IGF-1R susunan gen sampel nomor 8 dan 35 sama dengan kontrol normal nomor 11, sedang DMK9 sama dengan kontrol nomor 12. Hasil alignment IRR gene sequence memperlihatkan hanya pada susunan gen sampel nomor 8 yang terdapat perbedaan dibanding sampel lain.

Berdasarkan database GeneBank gen hIR ada dua macam varian dengan GeneID 3643, pada kromosom 19p13.3-p13.2 dan mempunyai 22 exon dengan panjang urutan mRNA 4200bp, gen IGF-1R dengan GeneID 3480, pada kromosom 15q26.3 dan mempunyai 21 exon dengan panjang urutan mRNA 4104bp, dan gen IRR dengan GeneID 3645, pada kromosom 1q21-q23 dan mempunyai exon berjumlah 22 dengan panjang gen 4148bp. Hasil

penelitian ini pada exon 22 ditemukan delesi tunggal Met<sup>1295</sup>→Cys<sup>1295</sup> dan Glut<sup>1300</sup>→Gly<sup>1300</sup> dan muatsi titik Met<sup>1296</sup>→Ser<sup>1296</sup> dan Trp<sup>1299</sup>→Ala<sup>1299</sup>, dan substitusi tunggal pada Met<sup>1389</sup>→Iso<sup>1389</sup>. Akibat delesi di dua tempat yang berdekatan menyebabkan perubahan frameshift susunan asam amino pada IR normal ada enam asam amino -Met Arg Met Cys Trp Glut- hasilnya menjadi lima asam amino -Cys Ala Ser Ala Gly-. Susunan polipeptida pada IR exon 22 ini merupakan bagian IR yang berada di sitoplasma. Perubahan ini diduga menyebabkan perubahan fungsi domain tirosine kinase pada protein IR, mutasi pada gen insulin receptor exon 22 mempunyai profil genetik sindrome yang berhubungan dengan resisten insulin.





## DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN DAN SUMMARY .....	iii
PRAKATA .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
BAB I. PENDAHULUAN .....	1
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA .....	3
BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	7
BAB IV. METODE PENELITIAN .....	8
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....	14
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....	16
DAFTAR PUSTAKA .....	17
LAMPIRAN	



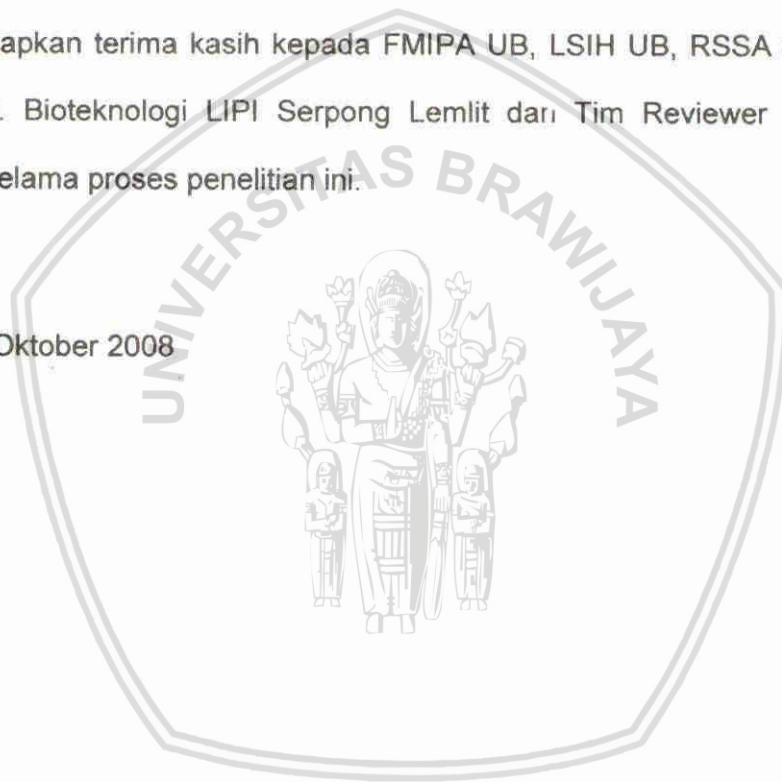
## PRAKATA

Alhamdulillahirobbil'alamin, telah dapat diselesaikan penelitian berjudul "analisis kelainan Insulin receptor family sebagai penanda awal sexual dysfunction pada penderita DM" pada tahap I dengan pendanaan PHB anggaran 2008. Penelitian masih perlu dilanjutkan pada tahun kedua dan ketiga untuk lebih melengkapi data-data yang lebih lengkap.

Demikian, semoga hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai salah satu acuan penelitian DM khususnya pada kelainan insulin receptor family. Tim peneliti DM mengucapkan terima kasih kepada FMIPA UB, LSIH UB, RSSA SPF Penyakit Dalam, Lab. Bioteknologi LIPI Serpong Lemlit dari Tim Reviewer dari UB atas kerjasama selama proses penelitian ini.

Malang, 25 Oktober 2008

Ketua Tim



## DAFTAR TABEL

Tabel 1 Gene Profile IR Family

19

Tabel 2 Primer Sequence for IR Family Genes

19





## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Gene of IR, IRR, and cDNA IGf-1R are amplified by using PCR with specific primers	20
Gambar 1 Dot Blot Analysis of IR Family	20
Gambar 2 Foto pasien mutasi IR	21



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Profil gen dan Urutan primer	19
Lampiran 2 Hasil PCR, Dot Blot dan foto pasien mutasi IR	21
Lampiran 3 Sequence Alignment IR family	22
Lampiran 4 Sequencing Result of IR, Igf-1 R, & IRR	25
Lampiran 5 Sertifikat Laik Ethik	32
Lampiran 6 Formulir inform consent	33



## BAB I

### PENDAHULUAN

Diabetes menghasilkan ketidakmampuan sel beta pankreas dalam mengatur level insulin dan menghambat hyperglycemia. Diabetes type 1 disebabkan kerusakan sel beta pankreas yang disebabkan oleh mekanisme imunitas, sedang diabetes type2 ini diderita oleh sebagian besar penderita diabetes, karena kombinasi dari faktor genetik dan lingkungan. Pada DM type2, produksi insulin tidak mencukupi atau penderita kehilangan kemampuan menggunakan insulin yang ada secara efisien. Berdasarkan berbagai hasil penelitian, menyebutkan bahwa insulin (IR) dan insulin growth factor type1 receptor (IGF-1R) meregulasi dua proses kunci pada siklus kehidupan sel beta, kedua receptor ini berperan pada saat pre- maupun post-natal di saat pertumbuhan dan perkembangan suatu jaringan/organ (Acilli et al., 1996; Joshi et al., 1996; Kitamura et al., 2001).

Tiga subfamily tersebut meliputi insulin receptor (Ir), *insulin-like growth factor type1 receptor* (Igflr) dan *insulin receptor-related receptor* (Irr). Aktivitas biologi dari Ir dan Igflr melalui perantara receptor yang ada di permukaan sel, kedua reseptor ini merupakan tyrosine kinase (Tk-ase) yang meregulasi berbagai signaling pathway melalui serial aktivitas fosforilasi (*series of phosphorylation cascades*). Ir dan Igflr adalah protein heterotetramik yang terdiri dari 2 *ligand-binding subunit- $\alpha$*  dan 2 *subunit- $\beta$*  yang masing-masing memiliki domain Tk-ase. *Insulin/Igfl binding* pada *extracellular domain* menginduksi autofosforilasi reseptor dan mengaktifkan aktivitas intrinsik Tk-ase, sehingga substrat menjadi substrat-phosphorylated. Sedang heterodimerik dari receptor Ir/Irr diaktivasi oleh insulin melalui signaling dari aktivitas Tk-ase seperti Ir dan Igflr (Acilli et al., 1996; Kitamura et al., 2001).

Kelainan diabetes yang disebabkan oleh abnormalitas insulin receptor memang jarang tetapi tidak berarti faktor ini bisa diabaikan. Kelainan pada receptor ini terjadi kemungkinan besar mempengaruhi abnormalitas metabolik dari mulai hyperinsulinemia, modest hyperinsulinemia dan kelainan diabetes yang parah (Greenspan and Gardner, 2004).



Perubahan dari struktur dan fungsi dari insulin reseptor diduga berkaitan dengan insulin-resisten lipoatropic diabetes, mungkin defect/kerusakan terjadi pada *proreceptor pathway*. Tetapi mekanisme ini belum jelas (Masharani et al., 2004).

Laporan dari jurnal American Medical Association pada tahun 1999 antara lain dari hasil survei yang meliputi 1.749 wanita dan 1.410 pria yang berumur 18-59 tahun, menyebutkan bahwa *sexual dysfunction* prevalensinya lebih tinggi pada wanita (43%) dibanding pria (31%). Diabetes diduga merupakan salah satu faktor yang berperan terjadi *sexual dysfunction* ini, kelainan seksual karena diabetes didominasi pada pria tapi tidak pada wanita. Banyak pria yang mempunyai problem impotensi pada kisaran umur 50-60 tahun atau lebih tua dari itu. Pada pria diabetes, problem impotensi tereksprei pada pria dengan umur lebih muda 10-15 tahun dibanding dengan pria tanpa diabetes. Estimasi insiden diabetes dengan impotensi pada pria akan meningkat lebih dari 40%. Kemungkinan diabetes mengakibatkan impotensi karena kerusakan syaraf atau pembuluh darah akibat pengaruh kandungan gula darah, hipertensi dan faktor lingkungan seperti konsumsi alkohol dan merokok (Lifeclinic, 2006). Sedangkan karena faktor genetik belum ada kajian spesifik untuk mengungkap ketidakmampuan seksual bagi pria muda diabetes.

Berdasarkan hasil penelitian dari Parada laboratorium group (Nef et al., 2003), kemungkinan besar peran dari insulin receptor pada penderita diabetes dapat menyebabkan kelainan seksual. Walaupun mekanisme hubungan antara insulin receptor dengan proses diferensiasi gonad jantan belum begitu jelas. Akan tetapi, kelainan seksual pada penderita diabetes akibat peran dari insulin reseptor family ini perlu dikaji lebih dalam.

### 2.1 Prevalensi Diabetes dan tipe diabetes

Data dari Departemen Kesehatan RI, yang dikutip oleh Menteri Kesehatan pada pembukaan Kongres Nasional VI Persatuan Diabetes Indonesia di Jakarta, 3 September 2005, mengungkapkan bahwa jumlah pasien diabetes rawat inap maupun rawat jalan di rumah sakit menempati urutan pertama dari seluruh penyakit endokrin. Peningkatan ini terutama diakibatkan oleh pertumbuhan populasi, pola makan yang tidak sehat, proses penuaan, obesitas, dan perubahan gaya hidup seperti gaya hidup sedentaris (kurang olah raga). Dari survey yang dilakukan oleh kelompok studi diabetes care Indonesia diperoleh bahwa pasien diabetes type2 banyak ditemukan di beberapa puskesmas Indonesia (Kompas, 2005, Soegondo dkk., 2001).

Diabetes dikelompokkan menjadi dua kelompok besar yaitu IDDM (*insulin dependent diabetes mellitus*) atau diabetes type1 dan NIDD (*non insulin dependent diabetes mellitus*) atau diabetes type2. Diabetes type1 sebagai akibat kelainan genetik. Kelainan genetik ini menyebabkan kerusakan sel-sel beta pankreas yang disebabkan oleh mekanisme sistem imun, autoimunitas. Penderita diabetes type1 umumnya pada masa kecil makanya disebut juga sebagai '*juvenile-diabetes*'. Tetapi bila type1 ini muncul pada saat dewasa maka dikenal sebagai diabetes tipe 1.5 atau LADA (*latent autoimmune diabetes in adult*), karena sistem imun menyerang sel-sel beta pankreas secara perlahan-lahan sehingga produksi insulin menurun. Penderita diabetes type2 sebagai hasil kombinasi faktor genetik dan lingkungan. Diabetes type2 ini diderita oleh sebagian besar penderita diabetes, produksi insulin tidak mencukupi atau penderita kehilangan kemampuan menggunakan insulin yang ada secara efisien. Penderita type2 didominasi pada penderita dewasa diatas 30 tahun, biasanya disertai obesitas. Diabetes type2 terkadang juga sudah diderita oleh anak-anak, kelompok ini disebut MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) (Polansky et al., 1996; Sathiel, 2001).



## 2.2 Overview insulin action

Kerja insulin dimulai dengan insulin berikatan dengan receptor insulin dan menembus reseptor pada permukaan sel. Insulin receptor merupakan membran glycoprotein yang tersusun atas dua subunit protein yang dikode oleh satu gen. Subunit protein yang besar (BM: 135.000) dikenal sebagai subunit alpha ( $\alpha$ ) terletak extracelluler dan dapat berikatan dengan insulin. Subunit-  $\alpha$  berikatan dengan subunit kecil (subunit- $\beta$ , BM 95.000) dengan *disulfide linkage*. Beta subunit terletak menembus membran dan sitoplasma domain yang mempunyai aktivitas sebagai tyrosine kinase yang akan mengawali *intraceluler pathway* (Masharani *et al.*, 2004). Ketiga insulin receptor (IR-IGF-1R-IRR) secara umum berbagi peran dalam *insulin signaling pathway*. *Protomechanism* dari *insulin signaling* adalah insulin berikatan dengan extraseluler domain dari insulin reseptor dengan mengubah konformasi reseptor, *receptor autophosphorylation* dan *tyrosine phosphorylation* dari substrat intraseluler protein. Beberapa cabang *signaling pathway* yang diinduksi insulin meliputi *insulin pathway* menginduksi pembentukan *tris-phosphorilated inositol*, mengaktifkan *phosphatidyinositol trisphosphate (PIP3)-dependent serine/threonine kinase*, dan memodulasi aktivitas enzim; *Grb2/SOS pathway* mengawali aktivitas *Ras-signaling* yang mengakibatkan sel proliferasi, meregulasi makanan, ekspresi gen; dan proto-oncogen *Cbl* mengaktifkan *Crk/TC-10 pathway* untuk mengatur translokasi *glucose transporter* melalui *PIP3-independent pathway* (Nandi *et al.*, 2004). Mekanisme ini berkaitan dengan glukosa uptake, sintesis glikogen, ekspresi gen target, survival sel, anti-lipolisis dan sintesis protein pada sel-sel beta.

## 2.3 Insulin receptor knockout

Untuk mengetahui fungsi suatu gen atau protein adalah dengan melakukan beberapa perlakuan pada gen tersebut seperti dengan cara *gene-knockout*, *knockdown analysis* dan teknik yang lain. Kelainan diabetes yang disebabkan oleh abnormalitas insulin receptor memang jarang tetapi tidak berarti factor ini bisa diabaikan. Kelainan pada receptor ini terjadi



kemungkinan besar mempengaruhi abnormalitas metabolik dari mulai hyperinsulinemia, modest hyperinsulinemia dan kelainan diabetes yang parah (Greenspan and Gardner, 2004). Perubahan dari struktur dan fungsi dari insulin reseptor diduga berkaitan dengan insulin-resisten lipotrophic diabetes, mungkin defect/kerusakan terjadi pada *proreceptor pathway*. Tetapi mekanisme ini belum jelas (Masharani et al., 2004).

Berdasarkan observasi secara *genetic engineering* pada mencit yang telah dihilangkan insulin receptornya pada insulin/insulin-like growth factor *signaling pathway* menunjukkan bahwa Ir dan Igf1r meregulasi dua proses kunci dari keberadaan sel-sel beta yaitu proliferasi sel beta dan sekresi hormon. Kulkani dalam Kitamura *et al* (2001) melaporkan tentang ablasi pada Insulin receptor (Ir) pada sel-sel beta pada daerah rekombinasi spesifik mengakibatkan abnormalitas regulasi glukosa dan kerusakan toleransi glukosa. Mencit tanpa insulin receptor (*Ir-knockout mice*) lahir dan tumbuh normal (90%), sisanya mati karena *diabetic ketoacidosis*. Fenotip ini mengindikasikan bahwa Ir penting untuk postnatal homeostasis energi, tetapi bukan untuk pertumbuhan prenatal atau kontrol metabolik (Acili *et al.*, 1996; Nakae *et al.*, 2001). Pada manusia yang tidak mempunyai Ir memperlihatkan retardasi pertumbuhan intrauterine yang parah, lipodistropi dan hypoglikemia (Hone *et al.*, 1995; Jospe *et al.*, 1996; Kadowaki *et al.*, 1988).

Mutasi *Igf1r* pada mencit menghasilkan embrio yang tidak berkembang atau tetap kecil, mati setelah lahir karena kelainan respiratori dan hanya 45% yang tumbuh normal. Kombinasi mutasi antara *Ir* dan *Igf1r* dapat mengakibatkan kelainan yang lebih parah, yang lahir normal lebih kecil dari 30% (Joshi *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1993). Tetapi berbeda dengan kedua reseptor, *Irr* knockout tidak menampakkan kelainan dan bisa tetap hidup normal tanpa perubahan fisiologis.

Identifikasi hibrid reseptor dari *Ir-Igf1r* dan *Ir-Irr* menghasilkan kompleksitas potensial signalling pada insulin receptor family. Untuk mengetahui lebih lanjut bila antara ketiga reseptor itu dimutasi atau knockout bersama secara *in vivo* pada mencit, Nef *et al.* (2003) telah berhasil melakukan percobaan ini dan secara mengejutkan insulin receptor family

ini mampu menginduksi *testicular differentiation* yang mana prosesnya tergantung pada gen Sr-Y. Mereka menganalisis embrio mencit umur 17.5-18.5 dpc (*days post coitus*) pada jantan dan betina dari mutasi tunggal Ir, Igflr, dan Irr, mutasi ganda Ir-Igflr, Ir-Irr dan Igflr-Irr, serta triple mutasi Ir-Igflr-Irr. Pada mutan tunggal dan ganda sistem genito-urinary embrio mencit berkembang normal dan tidak ada kelainan pada diferensiasi testis, testis seperti individu (XY) normal. Secara kontras, triple mutan embrio mencit, *Ir-Igflr-Irr knockout homozygote XY*, tidak ada yang memperlihatkan fenotip jantan. Gonad dari triple knockout Insulin reseptor family (XY) secara histologi sama dengan gonad betina (XX) normal. Dan dari hasil analisis molekuler pada gen-gen target yang terkait dengan diferensiasi testis, memperlihatkan bahwa marker sel sertoli testis (Mis, Sox9, dan Dhh) tidak terekspresi di gonad XY triple mutan, menariknya marker gen-gen target spesifik pada gonad betina terekspresi secara dominan, seperti Figa dan Wnt4. Lebih lanjut, ekspresi dari gen penentu jenis kelamin laki Sr-Y jauh berkurang konsentrasinya pada gonad XY triple mutan dibanding gonad XY normal. Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa insulin receptor family berperan dalam proses diferensiasi testis pada awal perkembangan embrio sebelum terjadinya indifferensiasi gonad menjadi gonad jantan (XX) dan betina (XY), seperti juga beberapa gen pada kromosom autosomal seperti Ad4BP/SF-1, Wt-1, Gata-4, Dax-1 dan lainnya yang berperan dalam *sex-reversal male-to-female* (Brenan and Capel, 2004).

### **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan sebagai berikut:

- a. Tahun I: Melacak kelainan gen *Igf1r*, *Ir* dan *Irr* dari penderita DM dan kontrol
- b. Tahun II: Mengakarakterisasi abnormalitas gen-gen insulin *receptor family* yaitu *Insulin growth factor type I receptor* (*Igf1r*), *Insulin receptor* (*Ir*) dan *Insulin receptor-related receptor* (*Irr*) dari penderita DM dan kontrol.
- c. Tahun III: Membuat probe spesifik yang dilabel dengan zat non-radioaktif.

### **Manfaat Penelitian**

- a. Menghasilkan penanda/marker baru spesifik orang Indonesia sehingga dapat digunakan sebagai alat deteksi dini kelainan seksual yang diakibatkan diabetes melitus
- b. Menghasilkan teknik analisis molekuler yang akurat untuk deteksi pre-diabetik pada anak-anak dan remaja.



## BAB IV

## METODE PENELITIAN

**4.1 Metoda Penelitian Tahun pertama:****1. Lokasi dan Tempat Penelitian**

Lokasi penelitian meliputi RSSA Malang, LSIH UB, Beberapa Klinik Medik di Malang, dan Lab. Bioteknologi LIPI Serpong.

**2. Pengajuan *Ethic Clearance*.**

Pengajuan ethic clearance ditujukan ke komisi etik penelitian medik di Fakultas Kedokteran UB. Pengambilan sample darah dilakukan setelah Sertifikat Layak Etik diperoleh.

**3. Pengambilan sample**

Pengambilan sample darah dan serum dari pasien penderita diabetes di bagian penyakit dalam RS. Saeful Anwar Malang. Sedangkan sampel kontrol diambil dari non penderita diabetes. Perbandingan sampel antara penderita DM dan kontrol 3:1 (Fatchiyah dkk., 1998). Semua sampel baik kontrol maupun penderita diabetes akan disimpan di *blood storage* untuk dianalisa di laboratorium. Dan sebelum pengambilan sampel darah/serum baik kontrol dan penderita diminta mengisi formulir "*Inform Concern*" kesediaan untuk diambil sampelnya sesuai ketentuan *International Scientific Bioethics*.

**4. Seleksi dan pengelompokan sampel penderita DM**

Seleksi dan pengelompokan uji sampel penderita DM berdasarkan data klinis dari bagian penyakit dalam RS. Saeful Anwar Malang.

**4.1 Metode Analisis Laboratorium****1. Prosedur Pengambilan darah**

Pengambilan darah dilakukan oleh petugas para medis yang ditunjuk. Sebelum melakukan pengambilan darah, tangan perawat yang sudah memakai sarung tangan disemprot dengan ethanol 70%. Pada pelipatan siku bagian dalam pasien disterilkan dengan ethanol 70%. Jarum *BD Vacutainer precisionGlide multi-sampling* dipasang terlebih dahulu pada vacutainer 3 ml. Kemudian jarum dimasukkan pada pembuluh darah vena perifer responden. Sampel darah yang diambil sebanyak 10 ml dengan rinciannya adalah 9 ml darah ditampung pada 3 vacutainer-EDTA 3 ml secara bergantian. Dan 1 ml darah ditampung pada spuit 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam microtube. Serum dipisahkan dari bagian darah yang lain untuk disimpan dan dianalisis pada tahun kedua.



## 2. Isolasi DNA/RNA dari darah

### A. DNA dengan nucleospin

1. Siapkan *microtube* 1,5 ml, beri label sesuai dengan nomor sampel.
2. Masukkan 200  $\mu$ l darah kedalam *microtube* 1,5 ml. Tambahkan 25  $\mu$ l Proteinase-K, kemudian dicampur rata. Tambahkan 200  $\mu$ l Lysis Buffer B3 ke dalam sampel dan vortex campuran dengan sempurna selama 20 detik.
3. Sampel diinkubasi pada suhu 70°C selama 30 menit (setiap 10 menit divortex)
4. Setelah inkubasi selesai, tambahkan 210  $\mu$ l ethanol absolut ke dalam masing-masing sampel dan vortex kembali selama 20 detik.
5. Untuk masing-masing sampel, ambil satu *NucleoSpin® Blood Column* yang telah diletakkan dalam *Collection Tube* (2 ml) dan masukkan sampel ke dalam *NucleoSpin® Blood Column*. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit. Jika sampel belum tersaring sempurna maka ulangi sentrifuse dengan kecepatan yang lebih besar. Buang *Collection Tube* beserta cairan yang ada didalamnya.
6. Letakkan *NucleoSpin® Blood Column* dalam *Collection Tube* baru (2 ml) dan tambahkan 500  $\mu$ l Buffer BW. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit. Buang *Collection Tube* beserta cairan yang ada didalamnya.
7. Ganti *Collection Tube* (2 ml) dengan yang baru, letakkan *NucleoSpin® Blood Column* dan tambahkan 600  $\mu$ l Buffer B5 (Buffer B5 concentrate: Ethanol absolute = 1: 4). Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit. Buang cairan yang ada di dalam *Collection Tube*.
8. Letakkan kembali *NucleoSpin® Blood Column* dalam *Collection Tube*. Untuk menghilangkan sisa ethanol pada membran silica, sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit.
9. Letakkan *NucleoSpin® Blood Column* dalam *microtube* 1,5 ml dan tambahkan 100  $\mu$ l prewarmed Elution Buffer BE (70°C). Buffer diteteskan langsung di tengah-tengah membran silica. Kemudian diinkubasi suhu ruang selama 1 menit. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit.
10. Sampel DNA dalam Elution Buffer BE yang diperoleh disimpan dalam freezer -20°C untuk analisa selanjutnya.

### B. RNA dengan nucleospin

1. Siapkan *microtube* 1,5 ml, beri label sesuai dengan nomor sampel.



2. Masukkan 200  $\mu$ l darah kedalam *microtube* 1,5 ml. Tambahkan 350  $\mu$ l Buffer RA1 dan 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanol, kemudian vortex campuran dengan sempurna selama 20 detik.
3. Untuk mengurangi kekentalan dan membersihkan *lysate*, masukkan sampel ke dalam *NucleoSpin® Filter Column* (ring berwarna ungu) yang telah diletakkan dalam *Collection Tube* (2 ml) dan sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit. Dalam beberapa kasus jika terdapat pellet maka pindahkan supernatant ke dalam *microtube* 1,5 ml baru.
4. Buang *NucleoSpin® Filter Column* dan tambahkan 350  $\mu$ l ethanol 70% dan homogenkan dengan cara pipeting sebanyak 5 kali.
5. Untuk masing-masing sampel, ambil satu *NucleoSpin® RNA II Column* (ring berwarna biru muda) yang telah diletakkan dalam *Collection Tube* (2 ml). Pipeting *lysate* sebanyak 2-3 kali dan masukkan *lysate* ke dalam *NucleoSpin® RNA II Column*. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 30 detik. Letakkan *NucleoSpin® RNA II Column* dalam *Collection Tube* baru (2 ml).
6. Tambahkan 350  $\mu$ l MDB (Membrane Desalting Buffer) dan sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit (untuk mengeringkan membran).
7. Siapkan DNase reaction mixture dalam *microtube* steril 1,5 ml. untuk masing-masing sampel: tambahkan 10  $\mu$ l reconstituted rDNase ke dalam 90  $\mu$ l Reaction Buffer for rDNase. Homogenkan dengan cara tabung dimix dengan jari (*licking*).
8. Masukkan 95  $\mu$ l DNase reaction mixture langsung ditengah-tengah membran silica column. Inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit.
9. Tambahkan 200  $\mu$ l Buffer RA2 pada *NucleoSpin® RNA II Column*. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 30 detik. Buang cairan pada *Collection tube*. Letakkan kembali *NucleoSpin® RNA II Column* dalam *Collection Tube* (2 ml).
10. Tambahkan 250  $\mu$ l buffer RA3 pada *NucleoSpin® RNA II Column*. Sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 2 menit. Letakkan *NucleoSpin® RNA II Column* dalam *Nuclease-free Collection Tube* (1,5 ml, tersedia dalam kit).
11. Larutkan RNA dalam 60  $\mu$ l RNase-free water (tersedia dalam kit) dan sentrifuse pada kecepatan 15.000 rpm, suhu 4°C selama 1 menit.

1000171



12. RNA dalam RNase-free water yang diperoleh disimpan dalam freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  untuk analisa selanjutnya.

3. Analisis PCR dengan primer spesifik dari IR family

Amplikasi DNA (PCR) dilakukan dengan metode PCR standar, dengan alat GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). Program disesuaikan dengan gene target dengan menggunakan primer spesifik sesuai target yang diharapkan.

4. Dot-blot hybridization

A. Aplikasi atau menempelkan DNA hasil PCR terlabel Biotin pada membran Nylon Hybond N+

a. 5  $\mu\text{l}$  DNA hasil PCR terlabel Biotin didenaturasi selama 10 menit pada suhu  $95^{\circ}\text{C}$ , kemudian segera ambil microtube 0,2 ml dan dimasukkan dalam *ice bath* untuk mencegah reannealing.

b. Membran Nylon Hybond N+ dipasang pada dot-blotter.

c. Sebanyak 1  $\mu\text{l}$  sampel DNA terlabel Biotin (terdenaturasi) diaplikasikan pada *dot-blotter*.

d. Dot-blotter dihubungkan dengan *vacum pump* selama 15-30 menit sampai semua sampel menempel pada membran Nylon Hybond N+.

e. Sampel diimobilisasi dengan cara menginkubasi Nylon Hybond N+ dalam oven pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit.

f. Membran Nylon Hybond N+ direhidrasi dalam DW beberapa menit pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

A. Visualisasi DNA hasil PCR terlabel Biotin menggunakan SA-HRP dan AEC

a. Membran Nylon Hybond N+ dimasukkan ke dalam kantong plastik klip yang berisi SA-HRP (streptavidin-horseradish peroxidase) 1: 1000 dalam buffer SA-HRP (0,01M Tris-Cl pH 7,4 ; 0,05M NaCl), diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.

b. Membran Nylon Hybond N+ dicuci dalam PBS 2 x 5 menit

c. Membran Nylon Hybond N+ dimasukkan ke dalam kantong plastik klip, kemudian ditambah 10 ml AEC (aminoethylcarbazole), diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit atau terbentuk warna merah.

**Stok solution AEC:** 4 g AEC dilarutkan dalam 100 ml dimethylformamide (DMF). Stok solution stabil selama 1 tahun pada suhu ruang. **Sebelum dipakai:** 0,67 ml AEC stok solution ditambah 10 ml 0,1M Sodium Acetate (pH 5,2), distirer, ditambah 10  $\mu\text{l}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan disaring.

d. Untuk menghentikan reaksi, membran dicuci dalam PBS 2x5 menit.

- e. Membran dicuci dengan DW, kemudian dikeringkan.

#### B. Dot Blot DNA/RNA

1. 1 ng sampel DNA/RNA didenaturasi selama 10 menit pada suhu 95°C, kemudian segera ambil microtube 0,2 ml dan dimasukkan dalam *ice bath* untuk mencegah reannealing.
2. Membran Nylon Hybond N+ dipasang pada dot-blotter.
3. Dengan menggunakan mikropipet, sebanyak 1 µl sampel DNA diaplikasikan pada *dot-blotter*.
4. Dot-blotter dihubungkan dengan *vacum pump* selama 15-30 menit sampai semua sampel menempel pada membran Nylon Hybond N+.
5. Sampel diimobilisasi dengan cara menginkubasi Nylon Hybond N+ dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit.
6. Membran Nylon Hybond N+ direhidrasi dalam DW beberapa menit pada suhu 37°C.

#### C. Prehibridisasi

1. Membran Nylon Hybond N+ tetap berada di dot blotter, ditambahkan 50µl 2x SSC (SSC dikondisikan terlebih dahulu pada suhu 60°C).
2. Membran Nylon Hybond N+ diinkubasi dalam waterbath pada suhu 65 °C selama 1 jam.
3. Dot Blotter ditutup dengan aluminium foil.

#### D. Hibridisasi

1. Larutan prehibridisasi dibuang
2. Larutan hibridisasi (mengandung DNA terlabel) sebanyak 10µl dimasukkan ke dalam lubang masing-masing sampel pada dot blotter, kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 15 menit.
3. Hibridisasi dilakukan selama 24 jam dalam waterbath pada suhu 60°C
4. Membran Nylon Hybond N+ hasil hibridisasi dicuci dengan 2x SSC, SDS 0,1% pada suhu 65°C selama 15 menit. Pencucian diulang dua kali pada kondisi yang sama.

#### Visualisasi DNA terlabel Biotin menggunakan SA-HRP dan AEC

1. Membran Nylon Hybond N+ tetap berada di dot blotter, tambahkan 10µl SA-HRP (streptavidin-horseradish peroxidase) 1: 1000 dalam buffer SA-HRP (0,01M Tris-Cl pH 7,4 ; 0,05M NaCl) dalam masing-masing lubang sampel pada dot blotter, diinkubasi selama 1 jam pada suhu ruang.
2. Membran Nylon Hybond N+ dicuci dalam PBS 2 x 5 menit



3. Membran Nylon Hybond N+ kemudian ditambah 10µl AEC (aminoethylcarbazole) dalam masing-masing lubang sampel pada dot blotter, diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit atau terbentuk warna merah.

*Stok solution AEC:* 4 g AEC dilarutkan dalam 100 ml dimethylformamide (DMF). Stok solution stabil selama 1 tahun pada suhu ruang. Sebelum dipakai: 0,67 ml AEC stok solution ditambah 10 ml 0,1M Sodium Acetate (pH 5,2), distirer, ditambah 10µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dan disaring.

4. Untuk menghentikan reaksi, membran dicuci dalam PBS 2x5 menit.
5. Membran dicuci dengan DW, membran Nylon Hybond N+ dilepas dari dot blotter kemudian dikeringkan.

#### 5. DNA Sequencing gen-gen IR Family

Sequencing dilakukan di lab. Bioteknologi LIPI serpong, dengan menggunakan ABI Prism Sequencer (Applied Biosystems) dan GeneAmp PCR Systems 9700 (Applied Biosystems). Cara Kerja yang dilakukan adalah:

- a. DNA sampel darah yang digunakan mempunyai konsentrasi 50-200 ng
- b. Sebelum sequencing dilakukan amplifikasi DNA dengan campuran reaksi PCR meliputi 8.0µl Terminator Read Reaction Mix, 50-200 ng DNA template, 3.2 pmol Primer Spesific, dH<sub>2</sub>O, total volume 20 µl. Campuran dimix dengan vortex 1 min, dan spindown dengan mini sentrifuse, kemudian dilakukan PCR
- c. PCR dikerjakan dengan program PCR sebagai berikut 25 cycles denaturasi 98°C selama 10 detik, annealing 50°C selama 5 detik, dan extension 60 °C selama 4 menit.
- d. Hasil PCR dimurnikan dengan cara semua PCR solution ditambah 125mM EDTA, mix dan ditambah 3x vol. Ethanol absolut, mix, inkubasi di suhu ruang 15 menit. Kemudian ifuse dengan kecepatan 15.000 rpm, temp. 4°C selama 20 menit. Pelet yang diperoleh ditambah 70% Ethanol, mix gentle, dan sentrifuse dengan kecepatan 15.000 rpm, temp. 4°C selama 5 menit. Dry-up 5 menit.
- e. Pelet ditambah 25µl Buffer sequencing, kemudian vortex 20 detik, mix dengan jari, inkubasi 2-3 min, kemudian PCR tube dipanaskan dengan air mendidih selama 3 menit, langsung masukkan on ice 5 min, spindown.
- f. Pindahkan semua larutan ke sequencing tube, lakukan sequencing dengan ABI Prism Sequencer (Applied Biosystems).



Hasil penelitian tahun pertama telah diperoleh sample darah dari 40 sample DM kontrol dan 21 sample DM dari RS. Saeful Anwar, Malang. Hasil amplifikasi DNA dengan analisis PCR (tabel 1, lampiran 1) menunjukkan bahwa untuk gene Insulin receptor (IR) telah diamplifikasi 64 sample 20 diantaranya pasien DM memperlihatkan hasil untuk gen hIR exon 14 : 2 homozygote dan 25 heterozygote; gen IR exon 21 : 23 homozygote dan 7 heterozygote; dan hIR Exon 22 : 27 homozygote dan 4 heterozygote. Untuk level transkripsi cDNA Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1 R) menunjukkan hasil 16 homozygote dan 10 heterozygote. Sedang hasil amplifikasi gene insulin receptor-related receptor (hIRR) diperoleh hasil 3 homozygote dan 11 heterozygote.

Pada beberapa sampel yang diduga sebagai pasien DM dengan kelainan seksual menunjukkan hasil untuk gen IR exon 14 pasien 8 mempunyai profile heterozygote, sedang pasien nomor 7,20,35 belum dideterminasi. Pada profile gen IR exon 21 terlihat 8 adalah homozygote sedang 7,20,35: belum dideterminasi. Profile gen IR exon 22 pada sample nomor 8 dan 35 menunjukkan profile homozygote, 20 profile gen heterozygote, dan sampel nomor 7 belum diterminasi. Pada cDNA IGF-1R, hasil amplifikasi kelompok pasien ini memperlihatkan pasien 8 mempunyai profile homozygote, sedang nomor 7, 20 dan 35 profile heterozygote. Untuk gen IRR hasil identifikasi adalah pasien 7 belum dideterminasi, dan pasien nomor 8, 20, dan 35 prifil gen heterozygote.

Analisis sequencing baru dilakukan sebagian sampel yang diduga menunjukkan kelainan, seperti pada lampiran 4. Sampel DNA lainnya akan dilakukan pada tahun kedua. Hasil sequence alignment untuk IR exon 22 menunjukkan pasien nomor 8 dan 35 yang diduga mempunyai kelainan dijumpai ada perbedaan dibanding dengan pasien DMK9 dan kontrol normal nomor 11. Berdasarkan alignment sequence dari cDNA IGF-1R susunan gen sampel nomor 8 dan 35 sama dengan kontrol normal nomor 11, sedang DMK9 sama dengan kontrol

nomor 12. Hasil alignment IRR gene sequence memperlihatkan hanya pada susunan gen sampel nomor 8 yang terdapat perbedaan dibanding sampel lain.

Receptor insulin terbagi dalam tiga subfamili *growth factor receptor tyrosines kinase*. Tiga subfamily tersebut meliputi insulin receptor (Ir), *insulin-like growth factor type1 receptor* (Igf1r) dan *insulin receptor-related receptor* (Irr). Hal yang menarik, meskipun struktur dari ketiga receptor ini sangat tinggi kesamaannya, tetapi berdasarkan fungsi berbeda satu dengan yang lain (Shier and Watt, 1989; Nakae *et al.*, 2001). *Insulin receptor* berfungsi untuk metabolisme energi, dan *insulin-like growth factor type1 receptor* berperan dalam pertumbuhan. Dan hanya Irr belum jelas fungsinya, receptor ini tidak bisa berikatan dengan insulin ataupun *insulin-like peptides* dan terlokalisasi di sel-sel beta (Kitamura *et al.*, 2001).

Berdasarkan database GeneBank gen hIR ada dua macam varian dengan GeneID 3643, pada kromosom 19p13.3-p13.2 dan mempunyai 22 exon dengan panjang urutan mRNA 4200bp, gen IGF-1R dengan GeneID 3480, pada kromosom 15q26.3 dan mempunyai 21 exon dengan panjang urutan mRNA 4104bp, dan gen IRR dengan GeneID 3645, pada kromosom 1q21-q23 dan mempunyai exon berjumlah 22 dengan panjang gen 4148bp. Hasil penelitian ini pada exon 22 ditemukan delesi tunggal Met<sup>1295</sup> → Cys<sup>1295</sup> dan Glut<sup>1300</sup> → Gly<sup>1300</sup> dan muatsi titik Met<sup>1296</sup> → Ser<sup>1296</sup> dan Trp<sup>1299</sup> → Ala<sup>1299</sup> dan substitusi tunggal pada Met<sup>1389</sup> → Iso<sup>1389</sup>. Akibat delesi di dua tempat yang berdekatan menyebabkan perubahan frameshift susunan asam amino pada IR normal ada enam asam amino -Met Arg Met Cys Trp Glut- hasilnya menjadi lima asam amino -Cys Ala Ser Ala Gly-. Susunan polipeptida pada IR exon 22 ini merupakan bagian IR yang berada di sitoplasma. Perubahan ini diduga menyebabkan perubahan fungsi domain tirosine kinase pada protein IR (gambar 4 lampiran 3). Kodawaki dkk (1990b) melaporkan bahwa mutasi pada gen insulin receptor exon 22 mempunyai profil genetik sindrome yang berhubungan dengan resisten insulin, demikian pula mutasi pada IR exon 14 (Kodawaki dkk., 1990a).

## BAB VI

## KESIMPULAN DAN SARAN

## 1. Kesimpulan

Pada penelitian ini telah diidentifikasi beberapa titik mutasi pada gen-gen IR family, seperti pada gen IR exon 22 ditemukan delesi tunggal  $\text{Met}^{1295} \rightarrow \text{Cys}^{1295}$  dan  $\text{Glu}^{1300} \rightarrow \text{Gly}^{1300}$ , dan mutasi titik  $\text{Met}^{1296} \rightarrow \text{Ser}^{1296}$  dan  $\text{Trp}^{1299} \rightarrow \text{Ala}^{1299}$ , dan  $\text{Met}^{1389} \rightarrow \text{Ile}^{1389}$ . Akibat delesi di dua tempat yang berdekatan menyebabkan perubahan frameshift susunan asam amino pada IR normal ada enam asam amino -Met Arg Met Cys Trp Glu- hasilnya menjadi lima asam amino -Cys Ala Ser Ala Gly-. Susunan polipeptida pada IR exon 22 ini merupakan bagian IR yang berada di sitoplasma. Perubahan ini diduga menyebabkan perubahan fungsi domain tirosine kinase pada protein IR.

## 2. Saran

Analisis sequencing baru dilakukan sebagian karena keterbatasan dana dan jumlah sample DNA, oleh karena itu sequencing hanya dilakukan pada sebagian sampel yang diduga menunjukkan kelainan. Sampel DNA lainnya akan dilanjutkan pada tahun kedua. Perlu dilanjutkan identifikasi tipe dan letak mutasi pada tahun kedua untuk lebih detail mengidentifikasi penyebab kelainan seksual pada penderita DM orang Indonesia. Hal ini penting untuk pembuatan probe yang spesifik orang Indonesia.





## DAFTAR PUSTAKA

- Acilli D., Y. Kido, J. Nake, D. Lauro, & BC. Park. 2001. Genetics of type2 diabetes: insights from targeted mouse mutants. *Curr. Mol. Med.* 1: 9-23.
- Ausubel FM., R. Brent, RE. Kingson, DD. Moore, JG. Seidman, JA. Smith, K. Struhl. 1995. *Short Protocols Molecular Biology Analysis*. 3<sup>rd</sup> Ed. John Wiley & Sons. Canada.
- Brennan J & B. Capel. One tissue, two fates: molecular genetics events that underlie testis versus ovary development. *Nature Reviews genetics* 2004, 5: 509-521.
- Greenspan FS. and DG. Gardner. 2004. *Basic and Clinical Endocrinology*. 7<sup>th</sup> Ed. McGrawHill. San Fransisco
- Fatchiyah, *Soeatmadji DW*, Hakim L, Rahayu M. Analysis of HLA DQB1 gene on Indonesian Population by PCR technique. *J of Natural* 1998 2(1): 1-5.
- Fatchiyah, M. Zubair, Y. Shima, S. Oka, S. Ishihara, Y. Katoh-Fukui, & KI. Morohashi. 2006. Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development. *Elsevier: BBRC*, 341: 1036-1045.
- Hone J. et al. 1995. Homozygosity for a null allele of the insulin receptor gene in patient with leprechaunism. *Hum Mutat* 6: 17-22
- Joshi N, PB. Kaplowitz, & RW. Furlanetto. 1996. Homozygote nonsense mutation in the Ir gene of a patient with severe congenital insulin resistance: leprechaunism and the role of Igf1. *Clin Endocrinol* 45: 229-235
- Lifeclicnic, 2006. Sex and Diabetes. <http://www.lifeclicnic.com/focus/diabetes/sex.asp>, 3/6/2006
- Kadowaki T, et al. 1988. Two mutant alleles of Ir gene in patient with extreme insulin resistance. *Science* 240: 787-790
- Kodawaki T, et al., 1990a. *PNAS* 87: 659-662
- Kodawaki T, et al., 1990b. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in Patients with genetic forms of Insulin resistance. *The Journal of clinical investigation* 86: 254-64
- Kitamura T, Y. Kido, S. Nef, J. Merenmies, LF. Parada, & D. Acilli. 2001. Preserved pancreatic  $\beta$ -cell development and function in mice lacking the insulin receptor-related receptor. *Mol Cell Biol* 21(6) : 5624-5630
- Kompas.2005. Jumlah Penderita di Indonesia Keempat Dunia. *Harian Kompas* Senin, 05 September 2005. <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0509/05/humaniora/2021476.htm>, 3/6/2006.
- Nandi A., Y. Kitamura, CR. Kahn, & D. Accili. 2004. Mouse models of insulin resistance. *Physiol Rev* 84: 623-647.
- Nef S., S. Verma-Kurvari, J. Merenmies, JD. Vassalli, A. Efstratiadis, D. Accili & LF. Parada. 2003. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature* 426 : 291-295
- Nakae J., Y. Kido, D. Accili. 2001. Distinct overlapping function of Ir and Igf1r. *Enco Rev* 22: 818-835
- Maniatis, T. Sambrook J, Fritsch, EF,. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Polansky KS, et al., 1996. NIDDM: a genetically programmed failure of the beta cells compensate for insulin resistance. N Engl J Med 334: 777-783.

Saltiel AR. 2001. New perspective into the molecular pathogenesis and treatment of the type 2 diabetes. Cell, 104: 517-529.

Shier P and Watt VM. 1989. JBC 264: 14605-14608

Soegondo S dkk. 2001. The Status of Diabetes control in Indonesia an National Audit of Patient with type 2 Diabetes mellitus in the year 2001. Diabcare Indonesia: 1-13.

Wild S., R. Gojka, A. Green, R. Sicree, & H. King. 2004. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 200 and projection for 2030. Diabetes Care 5 :1047-1053



## Lampiran 1 Profil gen dan Urutan primer

**Table1. Genes Profile IR Family**

No	Gene Name	Sample	Homozygote	Heterozygote	Remark
1	hIR-exon 14	64(20)	2	25	8: heterozygote 7,20, 35: ND
2	hIR-exon 21	64(20)	23	7	8: homozygote 7,20,35: ND
3	hIR-exon 22	64(21)	27	4	8, 35: homozygote 20:heterozygote 7: ND
4	cDNA hIGF1-R	64(21)	16	10	8: homozygote 7,20,35: heterozygote
5	hIRR	41(20)	3	11	7 : ND 8, 20, 35: heterozygote

**Table2. Primer sequence for IR Family Gene**

No	Gene Name	Primer name	Sequence
1	Insulin Receptor	hINSR-int13-F	5'-TGG ACA CTC CCA GAT GTG CA-3'
		hINSR-int14-R	5'-ACC ATG CTC AGT GCT AAG CA-3'
		hINSR-ex14-R	5'-GTC TGT CAC GTA GAA ATA G-3'
		hINSR-int20-F	5'-GTC TAA ATG GCT TCT TTG TTA CTA C-3'
		hINSR-int21-R	5'- TAC CCT TTC AAC GAA CAC CTC-3'
		F-hINSR-INT21(33)	5'-GAC TCA CCC AGG ACG TGT CCT TC-3'
		R-hINSR-EX22-4369	5'-CTC CAG GTT CAC AGT TAA ATC C-3'
2	IGF-1 Receptor	FcDNA hlgf1r	5'-TCGACATCCGCAACGACTATC-3'
		FcDNA hlgf1r	5'-CTTCTGTTCTTCTGGCCA-3'
3	Insulin-Related Receptor	F268 hIRR	5'-TTGAGATGCCACATCTGCGT-3'
		R833 hIRR -fatchy	5'-TGCTATTACGGGT GAAGCCA-3'





## Lampiran 2. Hasil PCR dan dot blot

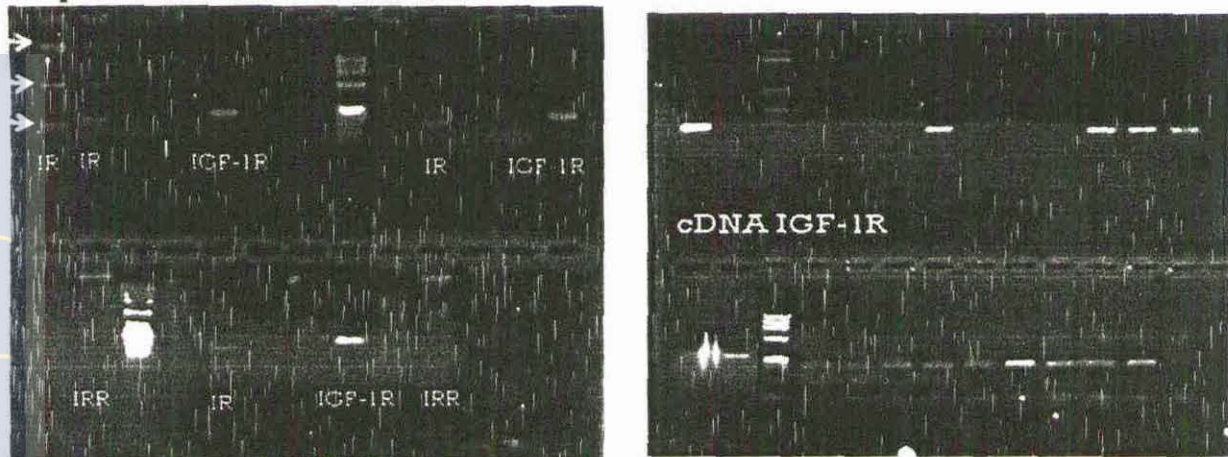


Figure1. Gene of IR, IRR, and cDNA IGF-1R are amplified by using PCR with specific primers.

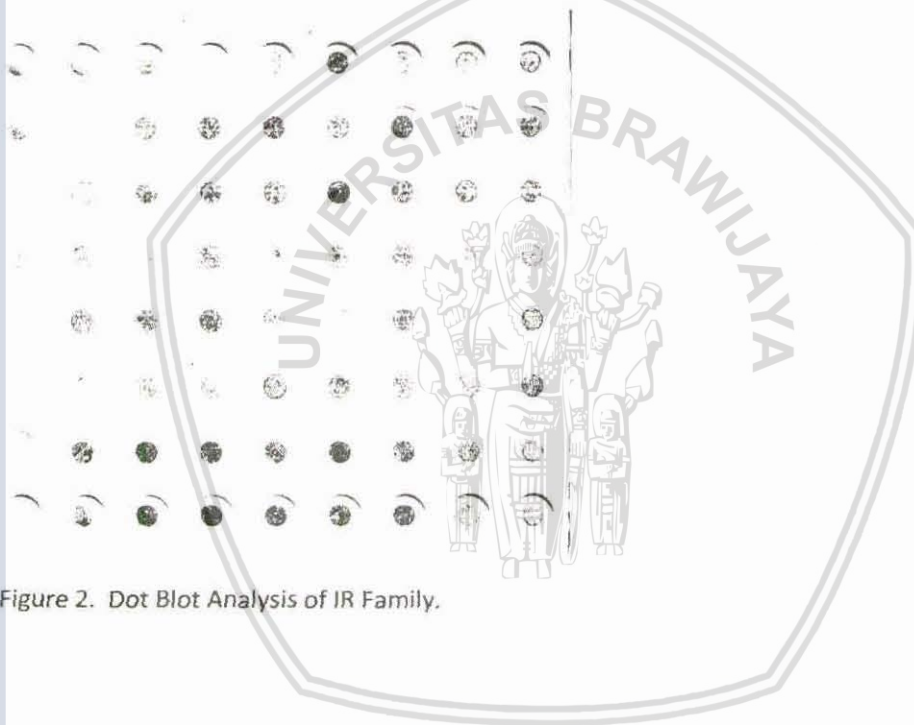
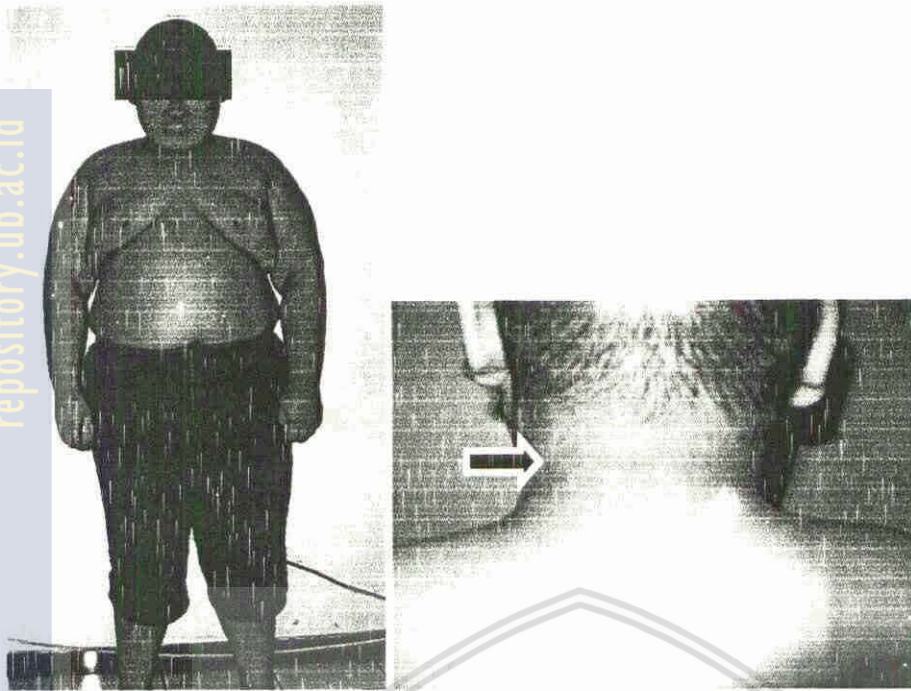


Figure 2. Dot Blot Analysis of IR Family.



Gambar 3. Foto-foto pasien DM dengan kelainan insulin reseptor, tanda panah menunjukkan penebalan kulit.

### Lampiran 3. Sequence Alignment IR family

#### A. Alignment of Sequencing human-IR exon 22 among sample 8, 35, DMK9, & 11

CTCGCG - ACTG	ACCTC-TG-CGC	AAGTCTG	ATTCAACCC	A TGA	CAA TCC	GAG -GT	CCT TCA	8
GGCGGA ACTG	ACCTCATG-CGC	ATGTGCTGGC	ATTCAACCCC	AAGATAAGGC	CAACCTTCCT-	GGAGATT-GTC	AACCT- GCTCA	35
GGTCTCGAATG	AC-TC -TGCGCG	AAGTGCAGGC	ATTCAACCCC	AAGATGAGGC	CAACCTTCCTA	GGAGATTAGTC	AACCTAGCTCA	DMK9
CG-CG-C-ACTG	ACCTC-TG-CGC	AAGTGTCTGGC	ATTCAACCCC	AAGATGAGGC	CAACCTTCCT-	GGAGATT-GTC	AACCT- GCTCA	11
AGGACGACCT -	GCACCCAGCT	TTCCAGAGGT -	GTCGTTCTTC	CACAGCGAGG	AGAACAAGGC	TCCCGAGAGT	GAGGAGCTGGA	8
AGGACGACCT -	GCACCCAGCT	TTCCAGAGGT -	GTCGTTCTTC	CACAGCGAGG	AGAACAAGGC	TCCCGAGAGT	GAGGAGCTGGA	35
AGGACGACCTA	GCACCCAGCT	TTCCAGAGGTA	GTCGTTCTTC	CACAGCGAGG	AGAACAAGGC	TCCCGAGAGT	GAGGAGCTGGA	DMK9
AGGACGACCT	GCACCCAGCT	TTCCAGAGGT -	GTCGTTCTTC	CACAGCGAGG	AGAACAAGGC	TCCCGAGAGT	GAGGAGCTGGA	11
GATGGAGTTT	GAGGACATGG	AGAATGTGCC	CCTGGACCGT	TCCTCGCACT	GTCAGAGGGA	GGAGGCGGGG	GGCCGGGATG	8
GATGGAGTTT	GAGGACATGG	AGAATGTGCC	CCTGGACCGT	TCCTCGCACT	GTCAGAGGGA	GGAGGCGGGG	GGCCGGGATG	35
GATGGAGTTT	GAGGACATGG	AGAATGTGCC	CCTGGACCGT	TCCTCGCACT	GTCAGAGGGA	GGAGGCGGGG	GGCCGGGATG	DMK9
GATGGAGTTT	GAGGACATGG	AGAATGTGCC	CCTGGACCGT	TCCTCGCACT	GTCAGAGGGA	GGAGGCGGGG	GGCCGGGATG	11
GAGGGTCCTC	GCTGGGTTT	CAAGCGGAGC	TACGAGGAAC	ACATCCCTTA	CACACACATA	AACGGAGGCA	AGAAAAACGG	8
GAGGGTCCTC	GCTGGGTTT	CAAGCGGAGC	TACAAGGAAC	ACATCCCTTA	CACACACATA	AACGGAGGCA	AGAAAAACGG	35
GAGGGTCCTC	GCTGGGTTT	CAAGCGGAGC	TACAAGGAAC	ACATCCCTTA	CACACACATA	AACGGAGGCA	AGAAAAACGG	DMK9
GAGGGTCCTC	GCTGGGTTT	CAAGCGGAGC	TACAAGGAAC	ACATCCCTTA	CACACACATA	AACGGAGGCA	AGAAAAACGG	11
GCGGATTCTG	ACCTTGCCCTC	GGTCCAATCC	TTCCTAACAG	TGCCTACCGT	GGCGGGGGCG	GGCAGGGGTT	CCCATTTTCG	8
GCGGATTCTG	ACCTTGCCCTC	GGTCCAATCC	TTCCTAACAG	TGCCTACCGT	GGCGGGGGCG	GACAGGGGTT	CCCC	35
GCGGATTCTG	ACCTTGCCCTC	GGTCCAATCC	TTCCTAACAG	TGCCTACCGT	GGCGGGGGCG	GGCAGGGGTT	CCCATTTTCG	DMK9
GCGGATTCTG	ACCTTGCCCTC	GGTCCAATCC	TTCCTAACAG	TGCCTACCGT	GGCGGGGGCG	GGCAGGGGTT	CCCATTTTCG	11
CTTTCCTCTGG	TTTGAAAGCC							8
								35
CTTT								DMK9
CT								11



		Met Arg Met Cys Trp Glut Phe Asp Pro Lys Met Arg Pro	
Normal	AATGACCTC	TGCGCA GTGC GGC ATTCAACCCCAAGATGAGGCCAAC	
DM patient	AATGACCTC	TGCGCAAGTGCAGGC ATTCAACCCCAAGATGAGGCCAAC	
		↓ Cys Ala Ser Ala Gly Phe Asp Pro Lys Met Arg Pro	
		↓ Del PM PM Del	
Pasien DM 32	FNPCKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPeseelemefedmeNVPLDRSSH	211	
Normal 1301	FNPCKMRPTFLEIVNLLKDDLHPSFPEVSFFHSEENKAPeseelemefedmeNVPLDRSSH	1360	
Pasien DM 212	CQREEAGGRDGGSSLGFKRSYEEHIPYTH I NGGKKNGRILTLPRSNPS	355	
Normal 1361	CQREEAGGRDGGSSLGFKRSYEEHIPYTH+NGGKKNGRILTLPRSNPS	1408	

Gambar 4. Alignment urutan gen hINSR exon 22 pasien terhadap urutan gen normal. Mutasi titik (PM) dan delesi (Del) tampak pada urutan gen pada pasien (huruf nukleotida merah) dan pada normal (huruf nukleotida biru). Akibat mutasi yang terjadi perubahan frameshift susunan poplipeptida.

#### B. Alignment of Sequencing human IGF-1 Receptor /cDNA IGF-1R

CTT	GGA --- CGCC	TGGAGACTGC	ACGGTGATCG	AGGGCTACCT	CCACATCCTG	CTCATCTCCA	AGGCCGAGGA	8
GAC-C	GGAAACCGCC	TGGAGACTGC	ACGGTGATCG	AGGGCTACCT	CCACATCCTG	CTCATCTCCA	AGGCCGAGGA	35
GAC--	GTAA -- CG -C	TGGAGACTGC	ACGGTG - TCG	AGGGCTACCT	CCACATCCTG	CTCATCTCCA	AGGCCGAGGA	DMK9
GAC--	GTAA -- CG -C	TGGAGACTGC	ACGGTGATCG	AGGGCTACCT	CCACATCCTG	CTCATCTCCA	AGGCCGAGGA	11
	TTAG -- CGCC	TGGAGACTGC	ACGGTG - TCG	AGGGCTACCT	CCACATCCTG	CTCATCTCCA	AGGCCGAGGA	12
CTACCGCAGCT	ACCGCTTCCC	CAAGCTCACG	GTCATTACCG	AGTACTTGCT	GCTGTTCCGA	GTGGCTGGCC	TCGAGAGCCTC	8
CTACCGCAGCT	ACCGCTTCCC	CAAGCTCACG	GTCATTACCG	AGTACTTGCT	GCTGTTCCGA	GTGGCTGGCC	TCGAGAGCCTC	35
CTACCGCAGCT	ACCGCTTCCC	CAAGCTCACG	GTCATTACCG	AGTACTTGCT	GCTGTTCCGA	GTGGCTGGCC	TCGAGAGCCTC	DMK9

CTACCGCAGCT	ACCGCTTCCC	CAAGCTCACG	GTCATTACCG	AGTACTTGCT	GCTGTTCCGA	GTGGCTGGCC	TCGAGAGCCTC	11
CTACCGCAGCT	ACCGCTTCCC	CAAGCTCACG	GTCATTACCG	AGTACTTGCT	GCTGTTCCGA	GTGGCTGGCC	TCGAGAGCCTC	12
GGAGACCTCT	TCCCCAACCT	CACGGTCATC	CGCGGCTGGA	AACTCTTCTAC	AACTACGCCC	TGGTCATCTT	CGA	8
GGAGACCTCT	TCCCCAACCT	CACGGTCATC	CGCGGCTGGA	AACTCTTCTAC	AACTACGCCC	TGGTCATCTT	CGA	35
GGAGACCTCT	TCCCCAACCT	CACGGTCATC	CGCGGCTGGA	AACTCTTCTAC	AACTACGCCC	TGGTCATCTT	CGA	DMK9
GGAGACCTCT	TCCCCAACCT	CACGGTCATC	CGCGGCTGGA	AACTCTTCTAC	AACTACGCCC	TGGTCATCTT	CGA	11
GGAGACCTCT	TCCCCAACCT	CACGGTCATC	CGCGGCTGGA	AACTCTTCTAC	AACTACGCCC	TGGTCATCTT	CGA	12



### C. Alignment of Sequencing human Insulin-related Receptor /IRR (168-833)

GGGGCCGGCC	GGCC- TTGGG	GCCGTGCTGC	GTGGGGCTGT	GCGTGTGGAG	AAGAACCAGG	AGCTCTGCCAC	CTCTCCACCA	8
AGGGACTGCCT	G-CCCTTGGG	GCCGTGCTGC	GTGGGGCTGT	GCGTGTGGAG	AAGAACCAGG	AGCTCTGCCAC	CTCTCCACCA	35
A--- A---CCT	G-CC-TTGGG	GCCGTGCTGC	GTGGGGCTGT	GCGTGTGGAG	AAGAACCAGG	AGCTCTGCCAC	CTCTCCACCA	DMK9
A--- --GCCT	GAAC-TTGGGG	GCCGTGCTGC	GTGGGGCTGT	GCGTGTGGAG	AAGAACCAGG	AGCTCTGCCAC	CTCTCCACCA	11
--GG- CTGCCT	-GCC-TTGGG	GCCGTGCTGC	GTGGGGCTGT	GCGTGTGGAG	AAGAACCAGG	AGCTCTGCCAC	CTCTCCACCA	12
TTGACTGGGG	ACTGCTGCAG	CCAGCACCTG	GCGCCAACCAC	ATCGTGGGCA	ACAAGCTGGG	CGAGGAGTGT	GCTGACGTGT	8
TTGACTGGGG	ACTGCTGCAG	CCAGCACCTG	GCGCCAACCAC	ATCGTGGGCA	ACAAGCTGGG	CGAGGAGTGT	GCTGACGTGT	35
TTGACTGGGG	ACTGCTGCAG	CCAGCACCTG	GCGCCAACCAC	ATCGTGGGCA	ACAAGCTGGG	CGAGGAGTGT	GCTGACGTGT	DMK9
TTGACTGGGG	ACTGCTGCAG	CCAGCACCTG	GCGCCAACCAC	ATCGTGGGCA	ACAAGCTGGG	CGAGGAGTGT	GCTGACGTGT	11
TTGACTGGGG	ACTGCTGCAG	CCAGCACCTG	GCGCCAACCAC	ATCGTGGGCA	ACAAGCTGGG	CGAGGAGTGT	GCTGACGTGT	12
GCCCTGGTGT	GCTGGGTGCT	GCTGGTGAGC	CCTGTGCCAA	GACCACCTTC	ACGCGGCACAC	TGACTACAGA	TGC	8
GCCCTGGTGT	GCTGGGTGCT	GCTGGTGAGC	CCTGTGCCAA	GACCACCTTC	AGCAGGCACAC	TGACTACAGA	TGCTGGACCT	35
GCCCTGGTGT	GCTGGGTGCT	GCTGGTGAGC	CCTGTGCCAA	GACCACCTTC	AGCAGGCACAC	TGACTACAGA	TGCTGGACCT	DMK9
GCCCTGGTGT	GCTGGGTGCT	GCTGGTGAGC	CCTGTGCCAA	GACCACCTTC	AGCAGGCACAC	TGACTACAGA	TGCTGGACCT	11
GCCCTGGTGT	GCTGGGTGCT	GCTGGTGAGC	CCTGTGCCAA	GACCACCTTC	AGCAGGCACAC	TGACTACAGA	TGCTGGACCT	12
CCAGCCACTG	CCAGAGAGGT	GGGCACTGGC	ACAGAACATG	AATGTAGC- A	TAGCAA- - - -	CA		8
CCAGCCACTG	CCAGAGAGGT	GGGCACTGGC	ACAGAACATG	AATGTAGGGA-	-AGGGAGAGAG	CAGGGTCACA	TGGGGCTGGG	35
CCAGCCACTG	CCAGAGAGGT	GGGCACTGGC	ACAGAACATG	AATGTAGGGA-	-AGGGAGAGAG	CAGGGTCACA	TGGGGCTGGG	DMK9
CCAGCCACTG	CCAGAGAGGT	GGGCACTGGC	ACAGAACATG	AATGTAGGGA-	-AGGGAGAGAG	CAGGGTCACA	TGGGGCTGGG	11
								12
TGGCCACAGG	ATGGTGTGGG	TCAGTACTTTCA	GCTGCCACTG	TTTTTTAATCC	TCACTCATCCTA	TGAGGCAGGT	AAGGAACTAAGG	8
TGGCCACAGG	ATGGTGTGGG	TCAGTACTTTCA	GCTGCCACTG	TTTTTTAATCC	TCACTCATCCTA	TAAGGCATGT- TG	ATG- -TTT CC - -	35
TGGCCACAGG	ATGGTGTGGG	TCAGTACTTTCA	GCTGCCACTG	TTTTTTAATCC	TCACTCATCCTA	TAAGGCAGGTA	ATG --AAACA AA	DMK9
								11
								12



## Lampiran 4. Sequencing Result of IR, Igf-1 R, & IRR

### 1. Hasil Sequencing human Insulin Receptor /IR int21(33) - ex22(4369) –Fatchiyah 2008

> 8-3F

CTCGCGACTGACCTCTGCGCAAGTGCTGGCATTCAACCCCAAGATGAGGCCAACCTTCTGGAGATTGTCAACCTGCTCAAGGACGACCTGCACCCCAGCTTTCCAGAGGTGTCGTTCT  
TCCACA<sup>^</sup>GCGAGGAGAACAAGGCTCCCGAGAGTGAGGAGCTGGAGATGGAGTTTGAGGACATGGAGAATGTGCCCTGGACCGTTCTCGCACTGTCAGAGGGAGGAGGCGGGG  
GCCGGGATGGAGGGTCTCGCTGGGTTTCAAGCGGAGCTACGAGGAACACATCCCTTACACACACATAAACGGAGGCAAGAAAAACGGGCGGATTCTGACCTTGCCTCGGTCCAATC  
CTTCCTAACAGTGCCTACCGTGGCGGGGGCGGGCAGGGGTTCCATTTTCGCTTCTCTGGTTTGAAAGCC

> 8-3R

CTGGGCCTGGTTATTGGTACCAAACGAGTCCACCTTAAGATGAACAGAAATGTATAGGAACGATCTCTGAACTCCACTGGACATGGTAGAGTCGTGAGAATCCTGAGTTTTCCAGAGG  
CTTTCAAACCAGAGGAAAGCGAAAATGGGAACCCCTGCCCGCCCCGCCACGGTAGGCACTGTTAGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGGTCAGAATCCGCCCGTTTTCTTGCCTCCG  
TTCATGTGTGTGTAAGGGATGTGTTCTCGTAGCTCCGCTTGAAACCCAGCGAGGACCCTCCATCCCGCCCCCGCTCCTCCCTGACAGTGCGAGGAACGGTCCAGGGGCACAT  
TCTCCATGTCCTCAAACCTC

> 35-3F

GGCGGAACTGACCTCATGCGCATGTGCTGGCATTCAACCCCAAGATAAGGCCAACCTTCTGGAGATTGTCAACCTGCTCAAGGACGCTGACCCCAGCTTTCCAGAGGTGTCGTT  
CTTCCACAGCGAGGAGAACAAGGCTCCCGAGAGTGAGGAGCTGGAGATGGAGTTTGAGGACATGGAGAATGTGCCCTGGACCGTTCTCGCACTGTCAGAGGGAGGAGGCGGGG  
GGCCGGGATGGAGGGTCTCGCTGGGTTTCAAGCGGAGCTACAAGGAACACATCCCTTACACACACATAAACGGAGGCAAGAAAAACGGGCGGATTCTGACCTTGCCTCGGTCCAA  
TCCTTCCTAACAGTGCCTACCGTGGCGGGGGCGGACAGGGGTTCCCC

> 35-3R

GGGGGCTGTTATTGGTACCAAACGAGTCCACCTTAAGATGAACAGAAATGTATAGGAACGATCTCTGAACTCCACTGGACATGGTAGAGTCGTGAGAATCCTGAGTTTTCCAGAGGCTT  
TCAAACCAGAGGAAAGCGAAAATGGGAACCCCTGCCCGCCCCGCCACGGTAGGCACTGTTAGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGGTCAGAATCCGCCCGTTTTCTTGCCTCCGTTT  
ATGTGTGTGTAAGGGATGTGTTCTCGTAACTCCGCTTGAAACCCAGCG

IR family

> DMK9-3F

GGTCTCGAATGACTCTGGCGCAAGTGCAAGCATTCAACCCCAAGATGAGGCCAACCTTCTAGGAGATTAGTCAACCTAGCTCAAGGACGACCTAGCACCCCAGCTTTCCAGAGGTAG  
TCGTTCTTCCACAGCGAGGAGAACAAGGCTCCCGAGAGTGAGGAGCTGGAGATGGAGTTTGAGGACATGGAGAATGTGCCCTGGACCGTTCTCGCACTGTCAGAGGGAGGAGGC  
GGGGGGCCGGGATGGAGGGTCTCGCTGGGTTTCAAGCGGAGCTACAAGGAACACATCCCTTACACACACATAAACGGAGGCAAGAAAAACGGGCGGATTCTGACCTTGCCTCGGT  
CCAATCCTTCTAACAGTGCCTACCGTGGCGGGGGCGGGCAGGGGTTCCATTTTCGCTT

> DMK9-3R

CCCCAGCTGTTTATTGGGTACCGCGAGTCCACCTTAAGATGAACAGAAATAGTATAGGAACGATCTCTGAACTCCACTGGACATGGTAGAGTCGTGAGAATCCTGAGTTTTCCAGAGG  
CTTTCAAACCAGAGGAAAGCGAAAAATGGGAACCCCTGCCCGCCCCCGCCACGGTAGGCACTGTTAGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGGTGAGAATCCGCCCGTTTTCTTGCCTCCG  
TTCATGTGTGTGAAGGGATGTGTTCTCGTAGCTCCGCTTGAACCCAGCGAGGACCTCCATCCCGCCCCCGCCTCCTCCCTCTGACAGTGCGAGGAACGGTCCAGGGGCACAT  
TCTCCATGTCTCAAACCTCATCTCCAGCTCCTCACTCTCGGGAGCCTTGTTCTCCTCGCT

> 11-3F

CGCGCACTGACCTCTGCGCAAGTGCTGGCATTCAACCCCAAGATGAGGCCAACCTTCTGGAGATTGTCAACCTGCTCAAGGACGACCTGCACCCCAGCTTTCCAGAGGTGTCGTTCTT  
CCACAGCGAGGAGAACAAGGCTCCCGAGAGTGAGGAGCTGGAGATGGAGTTTGAGGACATGGAGAATGTGCCCTGGACCGTTCTCGCACTGTCAGAGGGAGGAGGCGGGGGG  
CCGGGATGGAGGGTCTCGCTGGGTTTCAAGCGGAGCTACAAGGAACACATCCCTTACACACACATAAACGGAGGCAAGAAAAACGGGCGGATTCTGACCTTGCCTCGGTCCAATCC  
TTCCTAACAGTGCCTACCGTGGCGGGGGCGGGCAGGGGTTCCATTTTCGCT

> 11-3R

TCTTCACACATGTTAATTGGTACCAAACGAGTCCACCTTAAGATGAACAGAAATGTATAGGAACGATCTCTGAACTCCACTGGACATGGTAGAGTCGTGAGAATCCTGAGTTTTCCAGA  
GGCTTTCAAACCAGAGGAAAGCAAAAAATGGGAACCCCTGCCCGCCCCCGCCACGGTAGGCACTGTTAGGAAGGATTGGACCGAGGCAAGGTGAGAATCCGCCCGTTTTCTTGCCTC  
CGTTCATGTGTGTGAAGGGATGTGTTCTCGTAGCTCCGCTTGAACCCAGCGAGGACCTCCATCCCGCCCCCGCCTCCTCCCTCTGACAGTGCGAGGAACGGTCCAGGGGCAC  
ATTCTCATGTCTCAAACCTCATCTCCAGCTCCTCACTCTCGGGAGCCTTGTTCTCCT

IR family





## 2. Hasil Sequencing human IGF-1 Receptor /cDNA IGF-1R –Fatchiyah 2008

> 8-1F

CTTGACGCCTGGAGACTGCACGGTGATCGAGGGCTACCTCCACATCCTGCTCATCTCCAAGGCCGAGGACTACCGCAGCTACCGCTTCCCAAGCTCACGGTCATTACCGAGTACTT  
GCTGCTGTTCCGAGTGGCTGGCCTCGAGAGCCTCGGAGACCTCTCCCAACCTCACGGTCATCCGCGGCTGGAACTCTTCTACAACCTACGCCCTGGTCATCTTCGA

> 8-1R

GGAGGCTTCGGCCGCGGATGACCGTGAGGTTGGGGAAGAGGTCTCCGAGGCTCTCGAGGCCAGCCACTCGGAACAGCAGCAAGTACTCGGTAATGACCGTGAGCTTGGGGAAGCG  
GTAGCTGCGGTAGTCCTCGGCCTTGAGATGAGCAGGATGTGGAGGTAGCCCTCGATCACCCTGCAGTTCTCCAGGCGCTTCAGCTGCTGATAGTCGTTGCGGATGTCGAAA

> 35-1F

GACCGGAAACCGCCTGGAGACTGCACGGTGATCGAGGGCTACCTCCACATCCTGCTCATCTCCAAGGCCGAGGACTACCGCAGCTACCGCTTCCCAAGCTCACGGTCATTACCGAGT  
ACTTGCTGCTGTTCCGAGTGGCTGGCCTCGAGAGCCTCGGAGACCTCTCCCAACCTCACGGTCATCCGCGGCTGGAACTCTTCTACAACCTACGCCCTGGTCATCTTCGA

> 35-1R

TGGTAGCTCAGCCGCGGTGACCGTGAGGTTGGGGAAGAGGTCTCCGAGGCTCTCGAGGCCAGCCACTCGGAACAGCAGCAAGTACTCGGTAATGACCGTGAGCTTGGGGAAGCGG  
TAGCTGCGGTAGTCCTCGGCCTTGAGATGAGCAGGATGTGGAGGTAGCCCTCGATCACCCTGCAGTTCTCCAGGCGCTTCAGCTGCTGATAGTCGTTGCGGATGTCGAA

> DMK9-1F

GACGTAACGCTGGAGACTGCACGGTGTCGAGGGCTACCTCCACATCCTGCTCATCTCCAAGGCCGAGGACTACCGCAGCTACCGCTTCCCAAGCTCACGGTCATTACCGAGTACTTG  
CTGCTGTTCCGAGTGGCTGGCCTCGAGAGCCTCGGAGACCTCTCCCAACCTCACGGTCATCCGCGGCTGGAACTCTTCTACAACCTACGCCCTGGTCATCTTCGA

> DMK9-1R

GAGGGTTCAGCCGCGGATGACCGTGAGGTTGGGGAAGAGGTCTCCGAGGCTCTCGAGGCCAGCCACTCGGAACAGCAGCAAGTACTCGGTAATGACCGTGAGCTTGGGGAAGCGG  
TAGCTGCGGTAGTCCTCGGCCTTGAGATGAGCAGGATGTGGAGGTAGCCCTCGATCACCCTGCAGTTCTCCAGGCGCTTCAGCTGCTGATAGTCGTTGCGGATGTCAAA

> 11-1F

IR family



GACGTAACGCTGGAGACTGCACGGTGATCGAGGGCTACCTCCACATCCTGCTCATCTCCAAGGCCGAGGACTACCGCAGCTACCGCTTCCCCAAGCTCACGGTCATTACCGAGTACTT  
GCTGCTGTTCCGAGTGGCTGGCCTCGAGAGCCTCGGAGACCTCTTCCCCAACCTCACGGTCATCCGCGGCTGG/AACTCTTCTACAACTACGCCCTGGTCATCTTCGA

> 11-1R

TGGTCATCACGCCGCGGATGAACGTGTTAGTGGGGAAAAGTCTCCGAGGCTCTCGAGGCCAGCCACTCGGAACAGCAGCAAGTACTCGGTAATGACCGTGAGCTTGGGGAAGCGGT  
AGCTGCGGTAGTCCTCGGCCTTGGAGATGAGCAGGATGTGGAGGTAGCCCTCGATCACCGTGCACTTCCAGGCGCTTCAGCTGCTGATAGTCGTTGCGGATGTCAAAA

> 12-1F

TTAGCGCCTGGAGACTGCACGGTGTCGAGGGCTACCTCCACATCCTGCTCATCTCCAAGGCCGAGGACTACCGCAGCTACCGCTTCCCCAAGCTCACGGTCATTACCGAGTACTTGCTG  
CTGTTCCGAGTGGCTGGCCTCGAGAGCCTCGGAGACCTCTTCCCCAACCTCACGGTCATCCGCGGCTGGAACTCTTCTACAACTACGCCCTGGTCATCTTCGA

> 12-1R

GGAAGGCTTCAGCCGCGGATGACCGTGAGGTTGGGGAAGAGGTCTCCGAGGCTCTCGAGGCCAGCCACTCGGAACAGCAGCAAGTACTCGGTAATGACCGTGAGCTTGGGGAAGC  
GGTAGCTGCGGTAGTCCTCGGCCTTGGAGATGAGCAGGATGTGGAGGTAGCCCTCGATCACCGTGCACTTCCAGGCGCTTCAGCTGCTGATAGTCGTTGCGGATGTCAAA



### 3. Hasil Sequencing human Insulin-related Receptor /IRR (168-833) –Fatchiyah 2008

> 8-2F

GGGGCCGGCCCGCCTTGGGGCCGTGCTGCGTGGGGCTGTGCGTGTGGAGAAGAACCAGGAGCTCTGCCACCTCTCCACCATTGACTGGGGACTGCTGCAGCCAGCACCTGGCGCC  
AACCACATCGTGGGCAACAAGCTGGGCGAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAACGGGCACACTGACTACAG  
ATGC

> 8-2R

GGGACGGGGGGCCAGGCACTGCCCTGGTGTGCGAAGGTGGAGGCACGGCCGGGCACAGAGTGCAGGCTGGCACAGCGCTCAGCTGTGACACAGCGCCAGGACTCATACTGGTA  
GGTGCTGGCGGGCAGGCCACAGGCAAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAACGGGCACACTGACTACAG  
CACA

> 35-2F

AGGGACTGCCTGCCCTTGGGGCCGTGCTGCGTGGGGCTGTGCGTGTGGAGAAGAACCAGGAGCTCTGCCACCTCTCCACCATTGACTGGGGACTGCTGCAGCCAGCACCTGGCGCC  
AACCACATCGTGGGCAACAAGCTGGGCGAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAACGGGCACACTGACTACAG  
ATGCTGGACCTCCAGCCACTGCCAGAGAGGTGGGCACTGGCACAGAACATGAATGTAGCATTAGCAACA

> 35-2R

GGACTGGGGAAGGCACTGCCCTGGTGTGCGAAGGTGGAGGCACGGCCGGGCACAGAGTGCAGGCTGGCACAGCGCTCAGCTGTGACACAGCGCCAGGACTCATACTGGTAGGT  
GCCTGGCGGGCAGGCCACAGGCAAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAACGGGCACACTGACTACAG  
CGCCCCCTCGCTGTGCAAGCCATCCATGGGGGCAGGGGCACACTGTGGGGAGAGTGGTGTGTTAGACGTTGGCCATGCCCCCTCAGTCTGGCTGTCTTCCAATGCTGGCCCCACCC  
TGTTTCTCTGGGATGACTCA

> DMK9-2F

AACCTGCCTTGGGGCCGTGCTGCGTGGGGCTGTGCGTGTGGAGAAGAACCAGGAGCTCTGCCACCTCTCCACCATTGACTGGGGACTGCTGCAGCCAGCACCTGGCGCCAACCACAT  
CGTGGGCAACAAGCTGGGCGAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAACGGGCACACTGACTACAGATGCTGGA

CCTCCAGCCACTGCCAGAGAGGTGGGCACTGGCACAGAACATGAATGTAGGGAAGGGAGAGAGCAGGGTCACATGGGGCTGGGTGGCCACAGGATGGTGTGGGTCACTACTTTCA  
GCTGCCACTGTTTTTAATCCTCACTCATCCTATGAGGCAGGTAAGGAACTAAGG

> DMK9-2R

AGACAGGGGGCGGCACTGCCCTGGTGTGCCGAAGGTGGAGGCACGGCCGGGCACAGAGTGCAGGCTGGCACAGCGCTCAGCTGTGACACAGCGCCAGGACTCATACTGGTAGGT  
GCCTGGCGGGCAGGCCCACAGGCAGGCACCCTGGAAGTAGAGGTGGCGGCAAGCTACACAGGCACGAGGGTCTTCTGGCTGGCTGCAGCCCCCAGGATTCGGGGGGGGCACC  
CTCCCCCTCGCTGTGCAAGCCATCCCATGGGGGGCAGGGGCACACTGTGGGGAGAGTGGTGTGTTAACTTTGGCCATGCCCCCTCAGTCCTGGTTGTCCTTCAAATGCTGGCCCC  
ACCTGTTTCTCTTGAATAAACTCAATCTGCCCCAGGTCCCTCCAATTCAAAAAAACTGGTTGCCCCCTGTCCCTCCAAGGGAATATTGGAAAAAAGTATAAGAACTTAAACG

> 11-2F

AGCCTGAACTTGGGGGCCGTGCTGCGTGGGGCTGTGCGTGTGGAGAAGAACCAGGAGCTCTGCCACCTCTCCACCATTGACTGGGGACTGCTGCAGCCAGCACCTGGCGCCAACCAC  
ATCGTGGGCAACAAGCTGGGCGAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAGCGGGCACACTGACTACAGATGCTG  
GACCTCCAGCCACTGCCAGAGAGGTGGGCACTGGCACAGAACATAAATGTAGGGAAGGGAGAGAGCAGGGTCACATGGGGCTGGGTGGCCACAGGATGGTGTGGGTCACTACTTT  
CAGCTGCCACTGTTTTTAATCCTCACTCATCCTATAAGGCATGTGATGTTTCC

> 11-2R

GGGGCATGGGCAGGGCACTGCCCTGGTGTGCCGAAGGTGGAGGCACGGCCGGGCACAGAGTGCAGGCTGGCACAGCGCTCAGCTGTGACACAGCGCCAGGACTCATACTGGTAG  
GTGCCTGGCGGGCAGGCCCACAGGCAGGCACCCTGGAAGTAGAGGTGGCGGCAAGCTACACAGGCACGAGGGTCTTCTGGCTGGCTGCAGCCCCCAGGATTCGGTGTGGCAGC  
ACTCGCCCCCTCGCTGTGCAAGCCATCCCATGGGGGCAGGGGCACACTGTGGGGAGAGTGGTGTGTTAGACGTTGGCCATGCCCCCTCAGTCCTGGTGTCTTCCAATGCTGGCCCCA  
CCCTGTTTCTCTTGGGATGACACTCAATCTGCACCCAGGTCCCTCCCATTCAGATGACACTGGTTGCCGACTCTGTTCCCCTCCGATGGGATTCTTGAGGACAAGGACTGCGGCCGTCT

> 12-2F

GGCTGCCTGCCTTGGGGCCGTGCTGCGTGGGGCTGTGCGTGTGGAGAAGAACCAGGAGCTCTGCCACCTCTCCACCATTGACTGGGGACTGCTGCAGCCAGCACCTGGCGCCAACCA  
CATCGTGGGCAACAAGCTGGGCGAGGAGTGTGCTGACGTGTGCCCTGGTGTGCTGGGTGCTGCTGGTGAAGCCCTGTGCCAAGACCACCTTCAGCGGGCACACTGACTACAGATGCT  
GGACCTCCAGCCACTGCCAGAGAGGTGGGCACTGGCACAGAACATGAATGTAGGGAAGGGAGAGAGCAGGGTCACATGGGGCTGGGTGGCCACAGGATGGTGTGGGTCACTACT  
TTCAGCTGCCACTGTTTTTAATCCTCACTCATCCTATAAGGCAGGTAATGAAACAAA



> 12-2R

GGCGTGGGGCAGGCACTGCCCTGGTGTGCGAAGGTGGAGGCACGGCCGGGCACAGAGTGCAGGCTGGCACAGCGCTCAGCTGTGACACAGCGCCAGGACTCATACTGGTAGGT  
GCCTGGCGGGCAGGCCACAGGCAGGCACCCTGGAAGTAGAGGTGGCGCAAGCTACACAGGCACGAGGGTCTTCTGGCTGGCTGCAGCCCCCAGGCATTGGGTGTGGCAGCAC  
TCGCCCCTCGCTGTGCAAGCCATCCCATGGGGGCAGGGGCACACTGTGGGGAGAGTGGTGTGTTAGACGTTGGCCATGCCCCCTCAGTCCTGGCTGTCCTTCCAATGCTGGCCCCACC  
CTGTTTCTCTTGGGATGACACTCAATCTGCACCCAGGTCCCTCCCATTCAAATAACACTGGTTGCCGACTCCTTCCCCCCCCATGGAATCTTTGAAAAAAGACTGGGCCCCCTGT



IR family

Lampiran 5. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
THE ETHICAL COMMITTEE OF MEDICAL RESEARCH  
MEDICAL FACULTY – BRAWIJAYA UNIVERSITY**

KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
("ETHICAL CLEARANCE")

No: 143 /KEPK-FKUB/EC/VI /2008

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,  
SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN,  
DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : ANALISIS KELAINAN FUNGSI INSULIN RESEPTOR FAMILY SEBAGAI PENANDA AWAL  
SEXUAL-DYSFUNCTION PADA PENDERITA DIABETES MELLITUS

PENELITI UTAMA: Dra. Fatchiyah, M.Kes., Ph.D.

UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas  
Brawijaya, Rumah Sakit Saiful Anwar Malang dan  
Laboratorium Bioteknologi - BPPT - Serpong  
(untuk DNA sequencing)

DINYATAKAN LAIK ETIK

MALANG, 16 JUN 2008

KETUA

Prof.Dr.dr. M. Istiadjud ES, SpS, SpBS

33



LEMBAR INFORMASI DAN PERSETUJUAN PASIEN UNTUK  
PENELITIAN GENETIK  
"ANALISIS KELAINAN FUNGSI INSULIN RESEPTOR FAMILY SEBAGAI  
PENANDA AWAL SEXUAL-DISFUNCTION PADA PENDERITA  
DIABETES MELLITUS"

Study Code :

Subject initials:

Study Name :

Enrolment Code:

Centre No. :

Anda ditawarkan untuk ikut serta dalam penelitian. Sebelum Anda memutuskan untuk ikut serta, penting bagi Anda untuk mengetahui latar belakang, tujuan penelitian ini, bagaimana data Anda akan digunakan, berbagai prosedur dalam penelitian dan manfaat, resiko dan ketidaknyamanan yang mungkin terjadi. Kami mohon Anda menyediakan waktu untuk membaca Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien ini secara seksama dan mendiskusikannya dengan Dokter Peneliti Anda. Jika Anda sedang ikut serta dalam salah satu penelitian lain, Anda tidak dapat ikut serta dalam penelitian ini.

#### Latar Belakang Dan Tujuan Dari Penelitian Genetik

Di dalam tubuh Anda tersusun atas sel-sel. Pada tiap-tiap sel mengandung molekul yang disebut asam dioksiriboneukleat atau DNA yang membentuk gen Anda. Gen dapat mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan fungsi tubuh. Prevalensi diabetes mellitus (DM) secara global makin meningkat dan berdasarkan laporan WHO Indonesia menempati ranking ke empat dunia. Resistensi insulin berperan dalam patogenesis penyakit DM. Predisposisi dari resistensi insulin merupakan gabungan faktor genetik dan lingkungan. Analisa peran *reseptor insulin* (Ir-Igflr-Irr) yang terkait faktor genetik dan hubungannya dengan diabetes telah banyak dilakukan pada hewan coba. *Gene-disrupted* pada Ir-Igflr-Irr pada individu yang sama menyebabkan *sex-reversal* dari *male-to-female* secara spontan, hal ini diduga ketiga gen reseptor ini berperan pada diferensiasi sex. Selama ini, *sexual dysfunction* pada penderita DM selalu diasumsikan karena faktor lingkungan bukan karena faktor genetik. Diduga abnormalitas dari gen Igflr, Ir, dan Irr secara simultan berkaitan dengan *sexual dysfunction* yang terjadi pada DM. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kelainan sex pada penderita DM yang biasanya muncul setelah masa remaja atau dewasa, maka perlu dibuat suatu marker spesifik sebagai alat deteksi dini, agar tindakan preventif bisa dilakukan jauh sebelumnya.

Anda diminta untuk memberikan contoh darah untuk penelitian genetik yang akan menentukan struktur DNA Anda dan yang akan membantu kami untuk mendeteksi secara dini kelainan seksual yang diakibatkan DM. Penelitian yang kami minta Anda untuk ikut serta sekarang ini akan disebut 'Penelitian Genetik'. Kami menawarkan Anda dan pasien lain yang ikut serta dalam penelitian genetik untuk memberikan contoh darahnya karena kami ingin melacak kelainan gen Igflr, Ir dan Irr dari penderita DM dan kontrol; mengkarakterisasi abnormalitas pada insulin *receptor family* yaitu *Insulin growth factor type1 receptor* (Igflr), *Insulin receptor* (Ir) dan *Insulin receptor-related receptor* (Irr) dari penderita DM dan kontrol; mengidentifikasi kelainan urutan gen Igflr, Ir dan Irr dan keterkaitannya dengan gen penentu laki-laki seperti SRY dan menganalisis kelainan



hormon reproduksi seperti androgen/testosteron dan juga gen-gen yang berperan dalam seks diferensiasi. Penelitian genetik ini memiliki tujuan jangka panjang yaitu untuk menghasilkan penanda/marker baru spesifik orang Indonesia sebagai alat deteksi dini kelainan seksual yang diakibatkan diabetes melitus dan menghasilkan teknik analisis molekuler yang akurat untuk analisis penyakit autoimun. Kami tidak akan menggunakan contoh darah yang Anda berikan untuk tujuan lain.

#### **Apa yang Akan Terjadi dengan Saya Jika Saya memutuskan untuk Ikut Serta?**

Bila Anda memutuskan untuk ikut serta, memberikan contoh darah, kami akan mengambil sekitar 10 ml darah Anda. 10 ml darah tersebut antara lain akan digunakan untuk analisa RNA (3 ml), analisa DNA (3 ml) dan analisa protein (4 ml). RNA, DNA dan cDNA akan diambil dari contoh darah Anda di laboratorium Sentral Ilmu Hayati Unibraw (LSIH-UB) Malang. Pada proses ini, sebagian besar contoh darah akan dipergunakan, akan tetapi sebagian kecil contoh darah akan disimpan sebagai 'cadangan' jika ada masalah dalam pemeriksaan RNA, DNA dan cDNA Anda serta digunakan untuk penelitian pada tahun berikutnya.

Contoh RNA, DNA dan cDNA dan sisa contoh darah Anda akan disimpan bersama dengan contoh dari pasien lainnya di LSIH-UB Malang. RNA, DNA, cDNA dan contoh darah untuk penelitian genetik ini akan dihancurkan setelah 15 tahun sejak berakhirnya penelitian utama. Ada kemungkinan Anda masih akan dilibatkan pada penelitian lanjutan dalam jangka waktu tersebut.

#### **Apakah Risiko dan Rasa Tidak Nyaman yang Mungkin Terjadi Jika Ikut Serta?**

Anda akan merasa sedikit tidak nyaman pada saat pengambilan darah yang dilakukan di vena perifer di pelipatan siku bagian dalam Anda.

#### **Apakah Keuntungan yang Mungkin didapat dari Ikut Serta?**

Anda dapat mengetahui ada tidaknya kelainan genetik yang menyebabkan Anda mengalami DM dan gangguan seksual. Penelitian ini dapat memberi sumbangsih dalam pemahaman mengenai abnormalitas dari gen *Igf1r*, *Ir*, dan *Irr* secara simultan berkaitan dengan sexual dysfunction yang hanya terjadi pada penderita DM dan tidak terjadi pada kasus patologis yang lainnya. Selain itu, penelitian ini juga dapat menghasilkan marker sebagai deteksi dini bagi penderita DM sebelum *onset sexual dysfunction* terjadi sehingga penderita DM bisa melanjutkan hidupnya dengan kehidupan seks normal.

#### **Apakah Saya Harus Ikut Serta?**

Anda bebas untuk memutuskan ikut penelitian genetik ini atau tidak. Anda boleh menolak untuk memberikan contoh darah kapanpun tanpa sangsi atau kehilangan manfaat yang sudah merupakan hak Anda.

#### **Apakah Saya Menerima Bayaran untuk Ikut Serta?**

Anda tidak akan menerima pembayaran untuk ikut serta dalam penelitian genetik ini.



### **Hak Apa yang Saya Miliki untuk Melihat Penelitian Genetik dan Data Pribadi?**

Penelitian genetik ini akan memberi Anda hasil pemeriksaan Anda. Pihak peneliti tidak akan memberikan hasil penelitian genetik ini pada pihak lain manapun selain kepada Anda. Anda juga berhak untuk meminta perbaikan apabila ada kesalahan pada data pribadi Anda. Bila Anda berniat untuk melakukan perbaikan maka hubungi Dokter peneliti yang membantu Anda untuk menghubungi peneliti dengan segera.

### **Hak Apa yang Saya Miliki Sehubungan dengan Hasil Penelitian Genetik?**

Informasi apapun yang didapat secara langsung maupun tidak langsung dari penelitian genetik ini dan juga hak cipta, tes diagnostik, maupun produk biologik yang dihasilkan secara langsung maupun tidak langsung dari penelitian genetik ini adalah sepenuhnya milik peneliti dan dapat dipergunakan pemasaran. Anda tidak mempunyai hak atas properti ini atau bagian dari keuntungan yang didapat secara langsung maupun tidak langsung sebagai hasil penelitian genetik ini. Aka tetapi, dengan menandatangani lembar informasi dan persetujuan pasien untuk penelitian genetik ini, dengan memberikan sampel darah Anda untuk penelitian genetik, tidak menghilangkan hak Anda yang seharusnya Anda miliki karena keikutsertaan Anda dalam penelitian ini.

### **Tindakan Apakah yang Diambil untuk Memastikan Hasil Penelitian Genetik tersebut Bersifat Rahasia?**

Persiapan khusus yang dilakukan untuk memastikan bahwa penelitian genetik ini dilaksanakan dengan tingkat kerahasiaan yang tinggi. Contoh darah Anda akan ditandai sesuai dengan kode yang diberikan, tetapi tanpa data pribadi seperti nama Anda. Sebagai perlindungan tambahan, RNA, DNA dan cDNA yang didapat dari contoh darah yang Anda berikan juga akan diberi kode dan akan disimpan di tempat yang aman. Bila Anda berubah pikiran mengenai keikutsertaan Anda dalam penelitian genetik, catatan tersebut akan membantu kami dalam menemukan contoh Anda dan menghancurkannya. Catatan tersebut akan dihancurkan setelah 15 tahun setelah penelitian utama selesai, dan pada waktu yang bersamaan contoh RNA, DNA dan cDNA dan sisa contoh darah Anda akan dihancurkan.

Pemberian kode pada contoh darah dan hasilnya bertujuan untuk memastikan bahwa hasil penelitian genetik akan disimpan secara rahasia dengan cara menyimpan identitas Anda dan hasilnya secara terpisah. Hanya sedikit orang yang dapat menghubungkan identitas Anda dan hasil dari penelitian genetik atas DNA Anda, dan hanya untuk alasan khusus.

### **Dapatkah Saya Mengundurkan Diri Dari Persetujuan Saya?**

Anda boleh mengundurkan diri dari penelitian genetik ini kapanpun. Bila Anda memutuskan untuk mengundurkan diri, Anda harus menghubungi Dokter Peneliti atau orang lain yang tercantum pada Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien penelitian, dan jika memungkinkan untuk menandatangani dan memberi tanggal pernyataan tersebut (seperti yang tertera pada halaman terakhir Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien untuk Penelitian Genetik ini). Bila Anda mengundurkan diri **sebelum** contoh darah Anda dikirim untuk penelitian genetik, Dokter peneliti akan mengatur agar contoh darah tersebut dihancurkan. Bila Anda mengundurkan diri **setelah** contoh darah Anda dikirim untuk penelitian genetik, peneliti dan Dokter peneliti akan memastikan bahwa contoh darah Anda dan DNA yang telah diambil akan dihancurkan.

**SIAPA YANG HARUS DIHUBUNGI JIKA MEMBUTUHKAN INFORMASI TAMBAHAN  
ATAU BANTUAN?**

Bila Anda mempunyai pertanyaan mengenai penelitian ini, mohon menghubungi:

Peneliti : Dra. Fatchiyah, M.Kes, Ph.D.  
Alamat : Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH-UB)  
Jl. Veteran Malang 65145  
Telepon / HP : 0341-559054 / 081 738 2776

Anggota : Prof.Dr.dr. Djoko W. Soeatmadji, Sp.PD (KE)  
Alamat : Seksi Diabetes dan Endokrinologi, SMF Penyakit Dalam  
R.S. Saiful Anwar Malang  
Telepon / HP : 0341-357664 / 081 130 3257

Dari bila Anda mempunyai pertanyaan tentang hak Anda sebagai pasien dalam penelitian ini, Anda dapat menghubungi:

Nama : Prof.Dr.dr. Djoko W. Soeatmadji, Sp.PD (KE)  
Alamat : Seksi Diabetes dan Endokrinologi, SMF Penyakit Dalam  
R.S. Saiful Anwar Malang  
Telepon / HP : 0341-357664 / 081 130 3257





LEMBAR PERSETUJUAN PASIEN UNTUK  
PENELITIAN GENETIK

"ANALISIS KELAINAN FUNGSI INSULIN RESEPTOR FAMILY SEBAGAI  
PENANDA AWAL SEXUAL-DISFUNCTION PADA PENDERITA  
DIABETES MELLITUS"

Pernyataan Persetujuan

Saya.....(nama subjek) telah membaca dan saya mengerti semua informasi pada Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien untuk Penelitian Genetik ini. Saya telah diberi kesempatan untuk berdiskusi dan bertanya. Semua pertanyaan saya telah dijawab dengan memuaskan. Saya dengan suka rela menyetujui untuk ikut serta dalam penelitian genetik ini. Saya mengetahui bahwa saya akan menerima salinan dari pernyataan persetujuan ini.

Dengan menandatangani Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien untuk Penelitian Genetik ini dan ikut serta dalam penelitian genetik ini, saya tidak menyerahkan hak hukum apapun yang saya miliki sebagai subjek dalam penelitian. Saya mengizinkan pengambilan, penggunaan dan pemaparan informasi kesehatan saya sesuai dengan yang tercantum dalam Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien untuk Penelitian Genetik ini

Tanda tangan subjek

Tanggal

Untuk ditandatangani dan diberi tanggal oleh subjek

Nama Subjek (HURUF KAPITAL)

Tanda tangan Orang yang Menjelaskan  
Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien  
Penelitian Genetik

Tanggal

Nama Orang yang Menjelaskan  
Lembar Informasi dan Persetujuan Pasien untuk Penelitian Genetik (HURUF KAPITAL)

Tanda Tangan Wakil yang Sah

Tanggal

Nama Jelas Wakil yang Sah (HURUF KAPITAL)

Hubungan Wakil yang Sah dengan Subjek (HURUF KAPITAL)

Tanda Tangan Saksi yang Tidak Memihak

Tanggal

Nama Jelas Saksi yang Tidak Memihak (HURUF KAPITAL)

## Permintaan untuk Pengunduran Diri Persetujuan

Ya, saya ingin mengundurkan diri dari persetujuan saya untuk mengikuti penelitian genetik ini.

.....  
Tanda Tangan Subjek

.....  
Tanggal

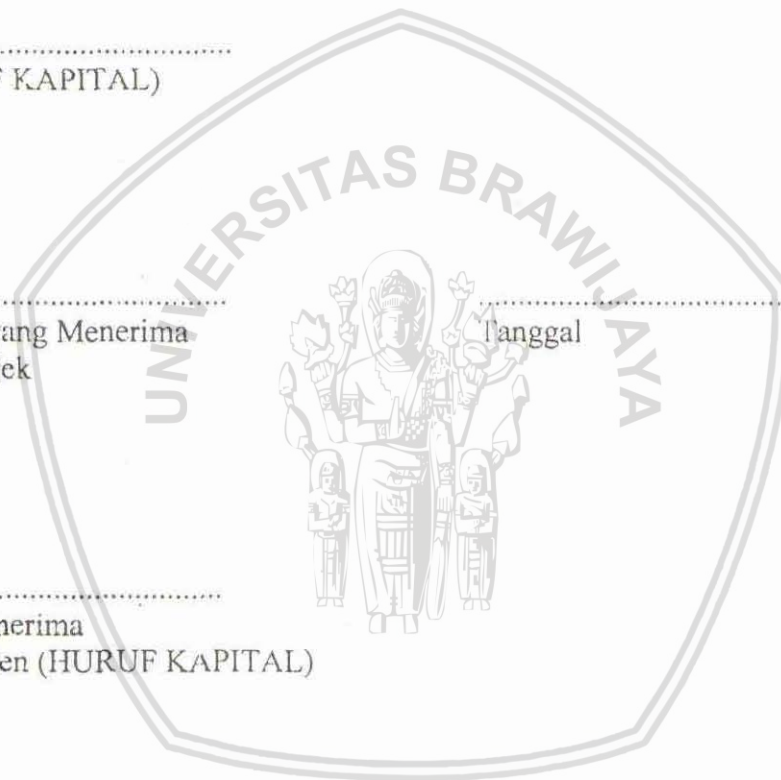
Untuk ditandatangani dan diberi tanggal oleh subjek

.....  
Nama Subjek (HURUF KAPITAL)

.....  
Tanda Tangan Orang yang Menerima  
Pengunduran Diri Subjek

.....  
Tanggal

.....  
Nama Orang yang Menerima  
Pengunduran Diri Pasien (HURUF KAPITAL)





**FORMULIR DATA RESPONDEN UNTUK PENELITIAN**

**Analisis Kelainan Fungsi Insulin Reseptor Family Sebagai Penanda Awal Sexual-Dysfunction Pada Penderita Diabetes Mellitus  
2008**

Dengan ini kami memohon kesediaan Bapak untuk mengisi formulir berikut dimana data yang Bapak sampaikan HANYA akan digunakan untuk keberlangsungan penelitian ini dan TIDAK akan digunakan untuk kepentingan lainnya. Adapun data yang Bapak sampaikan akan kami jaga kerahasiaannya.

Nama : \_\_\_\_\_

Umur : \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ) tahun

Lama Menikah : \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ) tahun

Jumlah Anak : \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ ) orang

Alamat : \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

No telepon rumah : ( \_\_\_\_\_ ) \_\_\_\_\_

No handphone : \_\_\_\_\_

Tanda tangan : \_\_\_\_\_

Tanggal : \_\_\_\_\_

1000171



**MILIK**  
**PERPUSTAKAAN**  
**Universitas Brawijaya**

Kami ucapkan terima kasih atas kesediaan Bapak untuk membantu kami dalam penelitian ini.